

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
mit Schwerpunkt Kardiologie, Angiologie und Pulmologie der  
Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin**

**DISSERTATION**

**„Der Effekt von Antithrombin III auf die pulmonalvaskuläre  
Freisetzung von Big Endothelin-1, Endothelin-1 und Prostanoiden  
unter septischen und nichtseptischen Bedingungen sowie seine  
Mechanismen“**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Pfannenschmidt, Gerd

aus Frankfurt(Oder)

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. R. Felix

Gutachter: 1.

2.

3.

Datum der Promotion:

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen .....</b>	<b>7</b>
	2.1 Antithrombin III	
	2.2 Endothelin	
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>10</b>
	3.1 Präparation	
	3.2 Modell „Isolierte Lunge“	
	3.3 Apparativer Aufbau zur volumenkonstanten Perfusion der isolierten Lunge	
	3.4 Bestimmung von Thromboxan A <sub>2</sub> und Prostazyklin	
	3.5 Bestimmung von Endothelin-1 und Big Endothelin-1	
	3.6 Datenanalyse	
<b>4</b>	<b>Wirkung von Antithrombin III auf die Prostanoid- und Endothelin-freisetzung nach LPS-Applikation .....</b>	<b>15</b>
	4.1 Protokoll	
	4.1.1 Kontrolle	
	4.1.2 Rezirkulation	
	4.2 Ergebnisse	
	4.2.1 Pulmonale Hämodynamik	
	4.2.2 Pulmonalvaskuläre Freisetzung von Thromboxan A <sub>2</sub> und Prostazyklin	
	4.2.3 Pulmonalvaskuläre Freisetzung von Big Endothelin-1 und Endothelin-1	

<b>5</b>	<b>Einfluß von Prostazyklin auf die durch Antithrombin III und LPS stimulierte Big Endothelin-1- und Endothelin-1-Freisetzung .....</b>	<b>20</b>
5.1	Protokoll	
5.2	Ergebnisse	
5.2.1	Pulmonale Hämodynamik	
5.2.2	Pulmonalvaskuläre Freisetzung von Big Endothelin-1 und Endothelin-1	
<b>6</b>	<b>Mechanismen der Stimulation der Big Endothelin-1- und Endothelin-1-Freisetzung durch Antithrombin III .....</b>	<b>22</b>
6.1	Protokoll	
6.2	Ergebnisse	
6.2.1	Pulmonale Hämodynamik	
6.2.2	Effekte der Pharmaka auf die pulmonalvaskuläre Freisetzung von Big Endothelin-1 und Endothelin-1 in Abwesenheit von Antithrombin III	
6.2.3	Effekte der Pharmaka auf den Antithrombin III-induzierten Anstieg der Big Endothelin-1 und Endothelin-1-Konzentration	
<b>7</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>26</b>
7.1	Effekte von LPS auf die pulmonalvaskuläre Freisetzung von Thromboxan, Prostazyklin, Big Endothelin-1 und Endothelin-1 sowie die pulmonale Hämodynamik	
7.2	Effekte von Antithrombin III auf die pulmonalvaskuläre Freisetzung von Thromboxan, Prostazyklin, Big Endothelin-1 und Endothelin-1 unter septischen und nichtseptischen Bedingungen	
7.3	Mechanismen der Antithrombin III-induzierten Stimulation der pulmonalvaskulären Big Endothelin-1- und Endothelin-1-Freisetzung	
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>32</b>
	<b>Literatur .....</b>	<b>33</b>

# 1 Einleitung

Das akute Lungenversagen - ARDS (adult respiratory distress syndrom) - ist mit einer Sterblichkeit von über 50 % eine der Hauptursachen für die Letalität nach schweren operativen Maßnahmen und multiplen Traumen<sup>1</sup>. Auslöser der weitgehend uniform in einer initialen exsudativen und einer subakuten proliferativ-fibrosierenden Phase verlaufenden pulmonalen Schädigung sind Polytrauma, Sepsis, Massentransfusion, Pankreatitis, nichtseptischer Schock, Aspiration, disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) und die Inhalation toxischer Gase<sup>2,3</sup>. Für internistische Patienten stellt die Sepsis dabei den häufigsten Auslöser dar<sup>4,5,6</sup>. Pathophysiologisch liegen dem ARDS eine Aktivierung inflammatorisch kompetenter Zellen (polymorphkernige Neutrophile [PMN], Makrophagen, Endothelzellen, Thrombozyten), die Aktivierung der Gerinnungs-, Komplement- und Kallikrein-Kinin-Kaskaden und die Freisetzung von Mediatoren (Eikosanoide, Endothelin [ET], Zytokine, Proteasen, freie Sauerstoffradikale, Plättchen-aktivierender Faktor [PAF]) zugrunde<sup>2,7</sup>. Die dadurch ausgelösten Gasaustauschstörungen resultieren aus der Schädigung der pulmonalen Hämodynamik (Mikroembolien, Vasokonstriktion) und der Ventilation (proteinreiches interstitielles und alveoläres Ödem, Atelektasen)<sup>8,9</sup>.

Beim durch Sepsis induzierten ARDS scheinen die Endotoxine gramnegativer Bakterien eine Schlüsselrolle zu spielen<sup>2</sup>. Es handelt sich dabei um thermostabile Lipopolysaccharidkomplexe (LPS), die als Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien bei deren Zerfall freigesetzt werden. Sie bestehen aus einem die serologische Spezifität determinierenden Saccharidanteil und einem für die Toxizität mitverantwortlichen Lipidanteil, welche fest aneinander gebunden sind<sup>10,11</sup>. LPS führt im Tierversuch über eine Komplementaktivierung zu einer Stimulation von zirkulierenden PMN und zur Freisetzung von Leukotrienen, Proteasen und Sauerstoffradikalen<sup>12,13</sup>. Weiterhin aktiviert LPS pulmonale Makrophagen, welche Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF $_{\alpha}$ ) freisetzen, was wiederum zur Aktivierung weiterer inflammatorisch kompetenter Zellen und zur Mediatorfreisetzung führt<sup>14,15</sup>. LPS verstärkt die pulmonale ET-Freisetzung in vivo<sup>16,17</sup> sowie in Kultur aus bovinen pulmonalarteriellen Endothelzellen (BPAEC)<sup>18</sup> und humanen aortalen Endothelzellen (HAEC)<sup>19</sup>. Auch die Vorstufe des ET, Big Endothelin (Big ET), wird unter septischen

Bedingungen verstärkt freigesetzt<sup>20</sup>. LPS kann daher im Tierversuch als Stimulus eines septischen Lungenversagens genutzt werden.

Im Tierversuch führte die Gabe der Antiprotease Antithrombin III (AT III) zu einer signifikanten Senkung der Sterblichkeit an LPS-induziertem ARDS<sup>21</sup>. Diese protektive Wirkung manifestierte sich histologisch in einer verminderten PMN-Infiltration sowie einer verringerten Permeabilitätsschädigung<sup>22</sup>. Sie wird in erster Linie auf eine AT-III-induzierte Stimulation der endothelialen Prostazyklin(PGI<sub>2</sub>)-Synthese zurückgeführt. Ein solcher Effekt ist aus Untersuchungen an kultivierten Endothelzellen (BPAEC und HAEC) bekannt, wobei die AT-III-Wirkung über Glykosaminoglykanrezeptoren vermittelt wird<sup>23,24</sup>. Heparin hemmt diesen Effekt durch Komplexbildung mit AT III<sup>21,22</sup>. Von PGI<sub>2</sub> ist bekannt, daß es als Suppressor aktivierter PMN wirkt<sup>25</sup> und die Produktion von Zytokinen durch mononukleäre Zellen, z.B. TNF<sub>α</sub> durch Makrophagen, unterdrückt<sup>26</sup>. TNF<sub>α</sub>, als Zytokin direkt an der Gewebsschädigung des ARDS beteiligt, hat daneben einen stimulierenden Effekt auf die ET-1-mRNA-Expression sowie die ET-1-Freisetzung<sup>27,28</sup>. Nach Razandi et al. hemmt PGI<sub>2</sub> die ET-1-Sekretion aber auch direkt via Stimulation der Guanylatzyklase<sup>29</sup>. Somit könnte eine PGI<sub>2</sub>-vermittelte Verminderung der ET-1-Synthese einen Beitrag zum protektiven Effekt des AT III bei sepsisinduziertem ARDS leisten.

In vivo lassen sich aber aufgrund der Komplexität der systemischen Mediatorantwort die unmittelbaren pulmonalen Effekte des AT III nicht isolieren. Aus diesem Grund wurde für diese Arbeit das Modell der isolierten Lunge verwandt, das es erlaubt, systemische humorale, hämodynamische, respiratorische und neuroregulatorische Einflußgrößen auszuschalten und somit gezielt die pulmonale Mediatorantwort auf AT III zu untersuchen.

Die Untersuchungen der Wirkung von AT III sind bisher nur am intakten Tier und in Zellkultur an nichtpulmonalen Endothelzellen durchgeführt worden. Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob AT III auch an der Lunge zu einer Erhöhung der vaskulären Freisetzung von PGI<sub>2</sub> sowie Thromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) als weiterem Produkt des Zyklooxygenaseweges führt.

Weiterhin sollte die Stimulation der pulmonalvaskulären Freisetzung von ET-1 und seiner Vorstufe, Big ET-1, unter septischen Bedingungen quantifiziert und eine

mögliche, durch  $\text{PGI}_2$  vermittelte Suppression dieser Freisetzung nach Applikation von AT III untersucht werden. Schließlich verfolgte die vorliegende Arbeit das Ziel, die Mechanismen der AT-III-vermittelten Effekte aufzuklären.

## **2 Grundlagen**

### **2.1 Antithrombin III**

Das Plasmaprotein AT III ist ein wichtiger Inhibitor der Serin-Proteasen<sup>30</sup>. Seine physiologische Hauptfunktion besteht in der Inaktivierung des Schlüsselenzyms der Gerinnungskaskade, Thrombin, wobei es mit diesem einen Komplex im Verhältnis 1:1 bildet<sup>31,32</sup>. Weiterhin inaktiviert AT III sowohl Gerinnungsfaktoren als auch fibrinolytische Enzyme, wie die Faktoren IXa, Xa, XIa, XIIa, Kallikrein, Urokinase und Plasmin, die alle Serin-Proteasen sind<sup>30</sup>.

AT III ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 65.000. Es wandert in der Elektrophorese mit der  $\alpha$ -Globulin-Fraktion der Plasmaproteine. Die physiologische Halbwertszeit des in der Leber synthetisierten AT III beträgt etwa 4 Tage. Der katabole Mechanismus ist wie bei anderen Gerinnungsfaktoren nicht genau bekannt<sup>30</sup>.

Das normale Plasma enthält mehr AT III- als Prothrombinmoleküle. Die inhibitorische Reaktion des AT III verläuft jedoch langsamer als die thrombinabhängige Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin, was Voraussetzung der Gerinnung ist. In Anwesenheit von Heparin ist die inhibitorische Aktivität von AT III durch eine Konformationsänderung des Moleküls massiv erhöht. Das erklärt den antikoagulatorischen Effekt des Heparins<sup>33</sup>.

Klinisch kommt vor allem dem AT III-Mangel eine Bedeutung zu. AT III-Spiegel unter 60% der Norm erhöhen das Risiko von Thrombembolien<sup>30</sup>. AT III-Mangel kann auf einer hereditären Synthesestörung, einer Lebererkrankung oder Proteinverlust bei Nierenerkrankungen beruhen<sup>34</sup>. Bei der disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC)

werden Serin-Proteasen in einem höheren Maße als AT III produziert. Es resultiert ein relativer AT III-Mangel. Zu den Komplikationen der DIC gehört durch disseminierte Thrombosierung der Mikrozirkulation das ARDS. Beiden Erkrankungen können als Auslöser beispielsweise gramnegative Sepsis, Polytrauma oder nichtseptischer Schock zugrunde liegen<sup>2,35</sup>.

## 2.2 Endothelin

Ein peptiderger endothelialer konstringierender Faktor - EDCF (endothelium-derived contracting factor) - wurde erstmals 1985 beschrieben<sup>36</sup> und 1988 aus dem Überstand von kultivierten Endothelzellen der Schweineaorta isoliert und sequenziert<sup>37</sup>. Das ET genannte Peptid besteht aus 21 Aminosäuren und besitzt 2 Disulfidbrücken. In der Tertiärstruktur bildet ET eine Helix. Neben dem zuerst beschriebenen ET-1 entdeckte man 2 Isoformen, die sich in der Primärstruktur in 2 (ET-2) bzw. in 6 (ET-3) Aminosäuren von ET-1 unterscheiden. Alle drei Unterformen sind von eigenen, auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisierten Genen kodiert<sup>37,38</sup>. Aus dem primären Syntheseprodukt Prä-pro-ET (bei Prä-pro-ET-1 203 Aminosäuren) entsteht durch Proteolyse Big-ET (39 Aminosäuren), das wiederum durch proteolytische Wirkung des endothelin-converting enzyme (ECE), von dem bereits verschiedene Subtypen (ECE 1  $\alpha$ , $\beta$ <sup>39</sup> und  $\gamma$ <sup>40</sup> sowie ECE 2<sup>41</sup>) spezifiziert wurden, in das aktive ET umgewandelt wird<sup>37</sup>.

Die drei Isoformen des ET werden in verschiedenen Geweben in unterschiedlichen Verteilungsmustern exprimiert. ET-1 wurde als einziger Vertreter der ET-Familie in Endothelzellen gefunden<sup>37,42</sup>. Weiterhin wird es vor allem in Gefäßmuskelzellen<sup>43</sup>, aber auch in nichtvaskulärem Gewebe synthetisiert<sup>44</sup>. ET-2 und ET-3 wurden nicht in Endothelzellen, jedoch in einer Vielzahl anderer Gewebe wie Gehirn, Leber und Niere nachgewiesen<sup>45,46</sup>.

ET-1 wird in sekretorischen Granula gespeichert<sup>47</sup>. Stimuli wie Hypoxie, Ischämie und Scherung können neben der Freisetzung von ET-1 aus diesen Granula auch innerhalb von Minuten die Transkription von ET-1-mRNA und nachfolgend die Synthese und Sekretion von ET-1 induzieren. Die Halbwertszeit der mRNA beträgt



15-20 Minuten<sup>48</sup> und die Plasmahalbwertszeit von ET-1 4-7 Minuten<sup>42</sup>. Bei der ersten Lungenpassage wird Plasma-ET-1 zu 50-90% aus dem Blut entfernt<sup>49,50</sup>. Unter physiologischen Bedingungen wird in der Pulmonalstrombahn jedoch annähernd ebensoviel ET-1 freigesetzt wie entfernt, so daß die pulmonalarterielle ET-1-Konzentration etwa der pulmonalvenösen ET-1-Konzentration entspricht (Quotient pulmonalarterieller/pulmonalvenöser Konzentration ca. 0,8-0,9)<sup>51</sup>. Dies unterstreicht die Bedeutung der Lunge für die Regulation der Plasma-ET-1-Konzentration, die beim Menschen bei circa 2 pg/ml liegt<sup>52</sup>. Da jedoch 75% des in Endothelzellen synthetisierten ET-1 abluminal sezerniert wird und seine Wirkung direkt am glatten Gefäßmuskel ausübt, ist ET-1 eher als parakrines denn als endokrines Hormon aufzufassen<sup>53</sup>.

Die zellulären Effekte von ET werden durch spezifische Rezeptoren vermittelt. Die Rezeptordichte und die Affinität sind gewebsspezifisch. Die nahezu irreversible Bindung<sup>54</sup> (extrem lange Dissoziationszeit) erklärt die Diskrepanz zwischen der kurzen Plasmahalbwertszeit und der über eine Stunde anhaltenden Vasokonstriktion nach Injektion eines ET-Bolus. Es lassen sich drei Gruppen von ET-Rezeptoren unterscheiden. Der ET<sub>A</sub>-Rezeptor bindet mit hoher Affinität ET-1 und mit jeweils abnehmender Affinität ET-2 und ET-3. Der ET<sub>B</sub>-Rezeptor bindet ET-1, ET-2 und ET-3 mit gleicher Affinität<sup>55</sup>. Ein ET<sub>C</sub>-Rezeptor ist bei Amphibien bekannt, wurde aber bei Säugetieren noch nicht beschrieben<sup>56</sup>.

ET<sub>A</sub>-Rezeptoren findet man in Gehirn, Herz, Lunge und Gefäßsystem. Sie sind vor allem auf Gefäßmuskelzellen und Herzmuskelzellen lokalisiert. ET<sub>A</sub>-Rezeptoren wirken über eine G-Protein-vermittelte Stimulation der Phospholipase C, die zur Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) führt<sup>57</sup>. Diese erhöhen als second messenger die intrazelluläre Kalziumkonzentration, wodurch letztendlich die Vasokonstriktion hervorgerufen wird<sup>58</sup>. Der ET<sub>B</sub>-Rezeptor, der bisher in Gehirn, Niere, Lunge und Gefäßsystem nachgewiesen wurde und vornehmlich auf Endothelzellen und weniger auf Gefäßmuskelzellen lokalisiert ist, vermittelt seine Wirkung ähnlich wie der ET<sub>A</sub>-Rezeptor über die Aktivierung der Phospholipase C, mit dem Unterschied, daß er auch an inhibitorische G-Proteine binden kann<sup>59,60</sup>. Wahrscheinlich müssen noch ET<sub>B1</sub>-Rezeptoren, die über NO eine Vasodilatation, und ET<sub>B2</sub>-Rezeptoren, die eine Vasokonstriktion vermitteln, unterschieden werden<sup>61,62</sup>.

Das auch als Pro-Endothelin bezeichnete Big-ET besitzt im Vergleich zum aktiven ET eine 140-fach geringere Affinität zum ET-Rezeptor<sup>63</sup>. Obwohl ECE-1 auch in der Lunge nachweisbar ist konnte nach Gabe von Big-ET eine Extraktion des Peptids aus dem Plasma beim Menschen<sup>64</sup>, beim Schwein<sup>65</sup> sowie bei Ratten<sup>66</sup> vor allem im Splanchnikus-<sup>67</sup> und renalen Stromgebiet<sup>64</sup> nicht jedoch in der Lungenstrombahn beobachtet werden.

ET ist der stärkste bisher identifizierte endogene Vasokonstriktor<sup>37,52</sup> und als einer der „endothelium derived contracting factors“ (EDCF) im Zusammenspiel mit den „endothelium derived relaxing factors“ (EDRF) an der Regulation des Vasotonus beteiligt. Die von ET ausgelöste - ET<sub>A</sub>-vermittelte - Kontraktion der Gefäßmuskulzellen ist konzentrationsabhängig<sup>68</sup>. In vivo induziert exogenes ET nach einem kurzen initialen Blutdruckabfall einen langanhaltenden Blutdruckanstieg<sup>69</sup>. Die transiente Hypotonie kommt - ET<sub>B1</sub>-vermittelt - durch den relaxierenden Effekt der Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) und PGI<sub>2</sub> zustande<sup>68,70</sup>.

ET spielt offensichtlich bei einer Vielzahl von Erkrankungen eine pathophysiologische Rolle. Bei einer Reihe von Lungenerkrankungen, wie primärer pulmonaler Hypertonie, Asthma, entzündlichen Lungenerkrankungen und ARDS wurden erhöhte Konzentrationen von Big-ET-1 und ET-1 im Plasma gemessen<sup>7,71,72</sup>. In der Lunge kann ET-1 von glatten Muskelzellen<sup>71</sup>, Endothel-<sup>73</sup>, Tracheoepithel-<sup>74</sup> und Bronchoepithelzellen<sup>75</sup> sowie Gewebsmakrophagen<sup>76</sup> synthetisiert werden. Einmal sezerniert kann ET-1 eine prolongierte Pulmonalarterienvasokonstriktion<sup>77</sup>, Bronchokonstriktion<sup>78</sup>, Aktivierung von Alveolarmakrophagen und die Freisetzung von Eikosanoiden auslösen<sup>79</sup>.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Präparation**

Für diese Studie wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 300-400 g verwendet. Das Narkotisieren der Tiere erfolgte mit Thiopental-

Natrium (40-80 mg/kg Körpergewicht [KG] intraperitoneal). Nach Eintritt des Atemstillstandes wurde ein Tracheostoma angelegt. Die Überdruckbeatmung mit einem Gasgemisch aus 21 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> und 74 % N<sub>2</sub> erfolgte über eine Trachealkanüle (Atemzugvolumen 8-10 ml/kg KG, Frequenz 60 Atemzüge/min, positiver endexpiratorischer Druck [PEEP] 1 mm Hg) durch einen Respirator (Servo 910, Siemens-Elema, Solna, Schweden). Nach einer mediosternalen Thorakotomie wurde die Pulmonalarterie kanüliert und die Lunge in situ mit eiskalter ( $\leq 4^{\circ}\text{C}$ ) modifizierter Krebs-Henseleit-Pufferlösung (Zusammensetzung in mmol/l: NaCl 127; KCl 3,7; CaCl 2,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; MgSO<sub>4</sub> 1,1; NaHCO<sub>3</sub> 24,9; Glukose 10; Pyruvat 1,8; N-2-Hydroxyethylpiperazin-n-2-ethansulfonsäure [HEPES] 5,9; pH=7,35-7,40) perfundiert. Das Herz wurde von der Lunge abpräpariert, so daß das Effluat frei aus den Pulmonalvenen abfloß. Dann wurde die Lunge aus dem Thorax gelöst und in einer feuchten, beheizbaren Lungenkammer an einen Gewichtsaufnehmer angeschlossen.

Das Atemzugvolumen wurde für 3-4 Atemzüge auf 15-17 ml/kg KG erhöht (deep breeze). Die zunächst albuminfreie Krebs-Henseleit-Lösung wurde dann durch eine 20 g/l Albumin enthaltende, sonst gleich zusammengesetzte Pufferlösung ersetzt. Der pulsatile pulmonale Anfangsfluß von 1,5-2 ml/min wurde in einem Zeitraum von 25 min allmählich auf 11 ml/min erhöht. Parallel dazu wurde die Temperatur des Perfusates sowie die der Lungenkammer (initial  $\leq 4^{\circ}\text{C}$ ) auf  $37,5^{\circ}\text{C}$  erhöht. Von diesem Vorgehen konnte ein möglichst vollständiges Ausspülen der Blutbestandteile und die geringstmögliche biochemische und biophysikalische Reaktion auf die Veränderung der Perfusionsbedingungen erwartet werden.

Der pulmonalarterielle Druck (PAP), die Atemwegsdrücke, sowie das Gewicht konnten kontinuierlich gemessen werden. Diese Parameter wurden mit einer Abtastfrequenz von 1,0 Hz unter Nutzung einer kommerziellen Software (Labwin, National Instruments) aufgezeichnet.

### **3.2 Modell „Isolierte Lunge“**

Die Apparatur für die isolierte Lunge (Abb.1) stammt von der Firma Hugo

Sachs Elektronik (March-Hugstetten, Deutschland). Eine Modifizierung der Anlage erlaubt ein Umschalten von einfacher (Durchfluß) in rezirkulierende Perfusion. Das rezirkulierende Perfusat wird vor jeder Lungenpassage zwischenoxygeniert und temperiert. Somit bleiben die Perfusionsbedingungen (Fluß, Temperatur, O<sub>2</sub>-Gehalt der Perfusionslösung) konstant.

### **3.3 Apparativer Aufbau zur volumenkonstanten Perfusion der isolierten Lunge**

Die benutzte Apparatur zur volumenkonstanten Perfusion einer isolierten Lunge besteht aus einem temperaturkonstant gehaltenen Vorratsgefäß für die Perfusionslösung, einem Wärmetauscher, in dem das Perfusat, mit einem Gemisch aus 21 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> und 74 % N<sub>2</sub> begast wird, einer Rollerpumpe, der beheizbaren Lungenkammer sowie einem Respirator (siehe Abb.1).

Der Wärmetauscher ist ein doppelwandiges Glasgefäß. Der Innenteil ist kugelig ausgebuchtet, um eine große Oberfläche zu erhalten. Das Gasgemisch wird im unteren Teil des Gefäßes eingeleitet und verläßt es durch ein Röhrchen auf der Oberseite über ein Gottliebsches Ventil (Überdruck-Tauchrohr). Die Begasung des Perfusates wird in diesem System nicht wie üblich mittels einer Gasdurchperlung erreicht, sondern ähnlich wie im bekannten Scheibenoxxygenator einer Herz-Lungen-Maschine durch einen dünnen Flüssigkeitsfilm auf einer großen Austauschfläche. Der Flüssigkeitspegel und damit die Perfusatmenge, die sich im Wärmetauscher befindet und 5 ml beträgt, wird über eine Niveauelektrode, einen elektronischen Regler und eine Pumpe konstant gehalten.

Die Lunge wird volumenkonstant perfundiert. Die Flußrate wird mit einer Rollerpumpe, die Perfusat aus dem Wärmetauscher fördert, konstant gehalten. Das Perfusat wird der Lunge über eine in der Pulmonalarterie eingebundene Kanüle zugeführt.

Um eventuell im Perfusat vorhandene Bläschen abzufangen, ist vor der Pulmonalarterienkanüle eine Blasenfalle installiert. Das Lungeneffluat fließt passiv

aus der Lunge ab, wird in der Einschlagphase verworfen und während der Rezirkulation mit einer Pumpe wieder in das Vorratsgefäß gefördert. Während der Rezirkulation beträgt die Gesamtmenge des in der Anlage befindlichen Perfusates 80 ml.

Die Lungenkammer besteht aus einem beheizbaren, doppelwandigen Glasgefäß, in dem die Lunge an der kanülierten Trachea an einem Gewichtsaufnehmer befestigt ist.

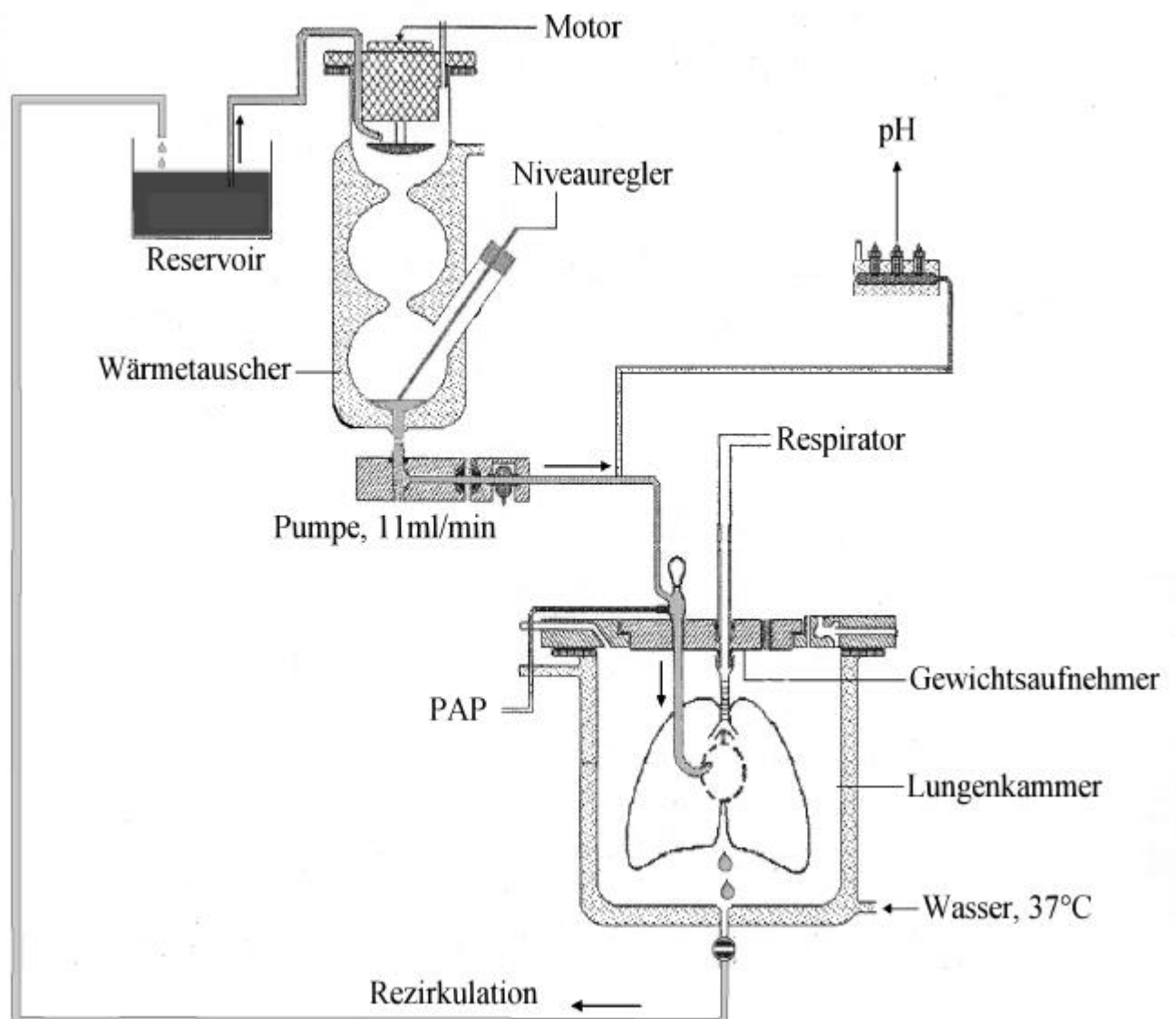


Abb.1 Schematischer Aufbau des Modells Isolierte Lunge

### 3.4 Bestimmung von Thromboxan A<sub>2</sub> und Prostazyklin

TxB<sub>2</sub> (stabiler Metabolit von TxA<sub>2</sub>) und 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> (stabiler Metabolit von PGI<sub>2</sub>) wurden aus nichtextrahierten Proben bestimmt. Die Methodik wurde an anderer Stelle ausführlich beschrieben<sup>80</sup>. Es wurden Eichlösungen von 2-100 pg/Ansatz für TxB<sub>2</sub> und 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> benutzt. Die Trennung von freier und gebundener Aktivität wurde mittels Aktivkohleabsorption durchgeführt. Die Nachweisgrenze, als 10 %ige Verdrängung des radioaktiven Tracers definiert, lag bei 2,5 pg/Ansatz für TxB<sub>2</sub> und bei 3,2 pg/Ansatz für 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>. Die Antikörper wurden in Kaninchen gezüchtet und zeigten praktisch keine Kreuzreaktivität (< 0,1 % bei 50 %iger Verdrängung des Tracers) gegenüber herkömmlichen Prostaglandin- und Thromboxan-Standards.

### 3.5 Bestimmung von Endothelin-1 und Big Endothelin-1

Die Konzentration von ET-1 wurde im Radioimmunoassay mit Hilfe eines kommerziellen Kits (Peninsula, Belmont, CA) bestimmt. Die Nachweisgrenze betrug ~0,15 pg/Ansatz; die Kreuzreaktivität für andere ET-Isomere und Big-ET-1 war geringer als 5 % und 37 %, jeweils nach Angaben des Herstellers. Für die Big-ET-1-Messung wurde ein polyklonales Antiserum gegen Big-ET-1 (1-39; Ratte) in Kaninchen gezüchtet. Eine Eichkurve wurde für Big-ET-1 (1-39; Ratte) für einen Meßbereich von 2-512 pg/Ansatz erstellt. Für die Messung wurden die Proben in einem Phosphatpuffer für 48 Stunden bei 4°C mit dem Antiserum (Verdünnung 1:10.000) inkubiert. Anschließend wurde für weitere 20 Stunden <sup>125</sup>I-Big-ET-1 (Anawa, Zürich, Schweiz) zugesetzt (Gesamtvolumen: 300 µl). Die gebundene Radioaktivität wurde mittels Polyethylenglykol separiert und mit einem γ-Zähler gemessen. Die Nachweisgrenze lag bei ~2 pg/Ansatz (~ 10 % Verdrängung des radioaktiven Tracers), und die IC<sub>50</sub> betrug 45 pg/Ansatz. Die unspezifische Bindung wurde mit 1 ng Big-ET-1 (1-39; Ratte) bestimmt und betrug somit ca. 4 % der Gesamtbindung. Die Kreuzreaktivität des Antiserums betrug mit Big-ET-1 (1-38; human) 9 %, mit Big-ET-1 (1-39; Schwein) 47 %, mit Big-ET-1-Fragment 22-39

(Rind) 16 %, mit ET-1, atrialem natriuretischen Faktor (1-28; Ratte) und Angiotensin II jeweils ~0,1 % bei IC<sub>50</sub>.

### **3.6 Datenanalyse**

Die Daten werden als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (STABW) angegeben. Die Untersuchung auf signifikante Gruppenunterschiede bezüglich der Mediatorkonzentrationen erfolgte mit Hilfe einer nichtparametrischen Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen<sup>81</sup>. Nach der globalen Testung wurde als multipler Vergleich der Students-Newman-Keuls-Test bzw. – zum Vergleich der einzelnen Gruppen mit der Kontrollgruppe – Dunnett's Test durchgeführt. Für die Zeitverläufe der hämodynamischen Größen wurde eine nichtparametrische two-way ANOVA verwendet<sup>81</sup>. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als signifikant angesehen.

## **4 Wirkung von Antithrombin III auf die Prostanoid- und Endothelfreisetzung nach LPS-Applikation**

### **4.1 Protokoll**

#### **4.1.1 Kontrolle**

Nach Einstellung einer Flußrate von 11 ml/min erreichten die Lungen in einer 20minütigen Kontrollperiode stabile hämodynamische und ventilatorische Ausgangswerte.

In die Studie wurden nur solche Lungen aufgenommen, die folgende Kriterien erfüllten:

1. eine homogene weiße Färbung der Lungenoberfläche ohne Zeichen eines Ödems, einer Einblutung oder von Atelektasen,
2. konstante pulmonalarterielle Drücke (4-6 mmHg bei einem pulmonal-venösen Druck von 0 mmHg) und ventilatorische Drücke (inspiratorischer Spitzendruck 7-10 mmHg, positiver endexpiratorischer Druck [PEEP] 1 mmHg),
3. kontinuierliche Gewichtsabnahme der Lunge während der Kontrolle,
4. konstantes Gewicht (maximale Zunahme 200 mg) bzw. Gewichtsabnahme während des gesamten weiteren Versuches.

#### 4.1.2 Rezirkulation

Nach Ablauf der Kontrolle wurde jede Lunge für 120 min rezirkulierend perfundiert (rezirkulierendes Volumen 80 ml). Das gesamte Perfusat wurde dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C zur Bestimmung von ET-1, Big-ET-1, TxB<sub>2</sub> und 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> aufbewahrt.

Der Versuch erfolgte in drei Gruppen:

1. In der *LPS-Gruppe* (n=11) erfolgte am Beginn der Rezirkulationsphase eine pulmonalarterielle Bolusinjektion von *Salmonella-minnesota-Endotoxin* (gelöst in 1 ml Phosphat-Pufferlösung mit 50 mg/l Hydroxylamin), die zu einer Konzentration von 50 µg LPS/ml<sup>82</sup> im Rezirkulat führte. In zusätzlichen Versuchen (n=3) wurde gezeigt, daß die Bolusinjektion des Lösungsmittels allein keinen Effekt auf die pulmonale Hämodynamik sowie die Freisetzung von TxB<sub>2</sub>, 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>, Big-ET-1 und ET-1 hat.



2. In der *AT-III-Gruppe* enthielt das rezirkulierende Perfusat entweder 2 U/ml AT III (n=10), was der therapeutischen Dosis in klinischen Studien nach Fourier et al.<sup>83</sup> entspricht, oder 5 U/ml AT III (n=13), was die Maximalkonzentration hinsichtlich der Stimulation der PGI<sub>2</sub>-Synthese in Zellkultur darstellt<sup>24</sup>. AT III wurde für jeden Versuch frisch gelöst dem Perfusat zugesetzt.
3. In der Gruppe *AT III + LPS* wurden die Lungen in Anwesenheit von 2 U/ml AT III und 50 µg/ml LPS (n=5) perfundiert, was den in-vivo-Bedingungen im Tierexperiment<sup>84</sup> und im klinischen Versuch<sup>83</sup> entspricht.

Als Kontrolle dienten mit einem lediglich Hydroxylamin enthaltenden Puffer perfundierte Lungen (n=13).

Bovines Albumin, Endotoxin von *Salmonella minnesota* und Hydroxylamin stammten von Sigma Chemical (München, Deutschland). AT III (Aktivität 6,6 IU/mg) wurde von Centeon Pharma (Marburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

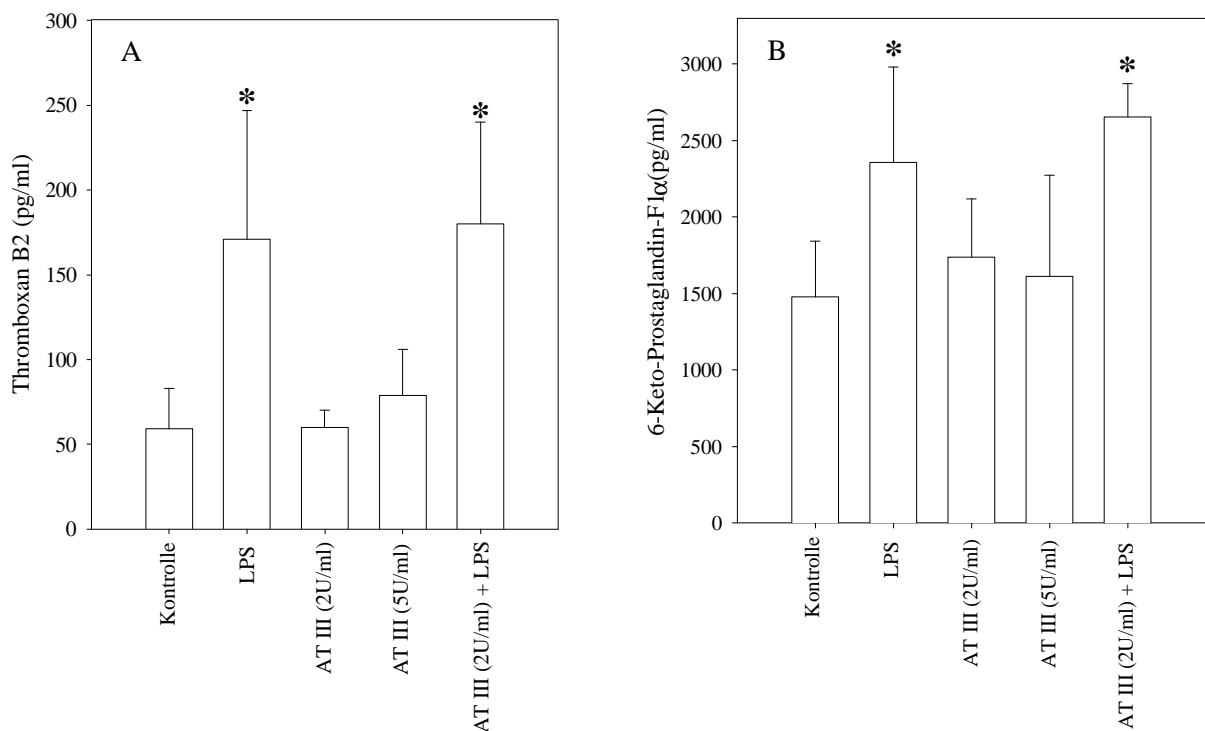
## 4.2 Ergebnisse

### 4.2.1 Pulmonale Hämodynamik

Der mittlere pulmonalarterielle Druck zeigte keine Zeitabhängigkeit und keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Er lag im Mittel aller Versuchsgruppen bei  $5,2 \pm 0,6$  mmHg. Es wurden weiterhin in keiner der Gruppen Änderungen des Gewichtes, die für eine veränderte Permeabilität sprechen würden, beobachtet.

## 4.2.2 Pulmonalvaskuläre Freisetzung von Thromboxan A<sub>2</sub> und Prostazyklin

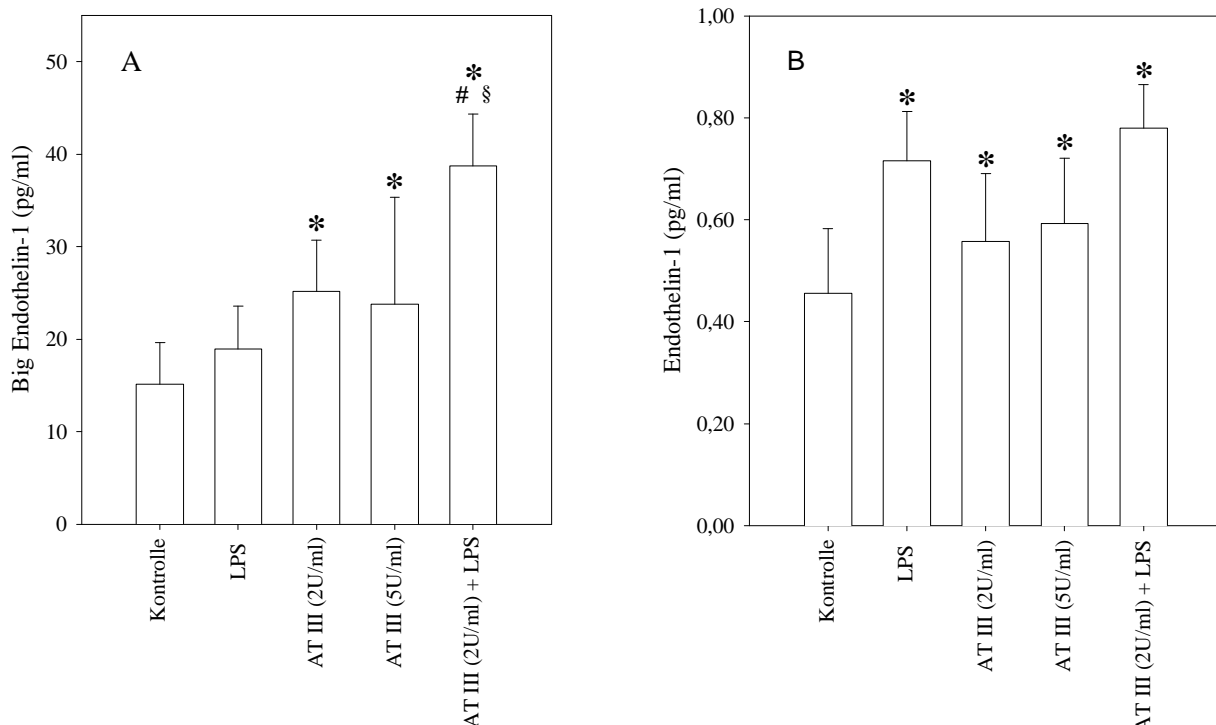
Die Effekte von LPS und/oder AT III auf die Freisetzung von TxB<sub>2</sub> und 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> werden in Abb.2 gezeigt. Im Effluat der Kontrollungen wurden Konzentrationen von 59±23 pg/ml TxB<sub>2</sub> und 1480±364 pg/ml 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> gemessen. In der *LPS-Gruppe* stieg die Freisetzung von TxB<sub>2</sub> auf das 2,9fache und die von 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> auf das 1,6fache (jeweils p<0,05). Die Gabe von AT III hatte weder in einer Konzentration von 2 U/ml noch von 5 U/ml einen Effekt auf die TxB<sub>2</sub>- und 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>-Spiegel. Die Applikation von LPS und 2 U/ml AT III hatte keine stärkeren Effekte als die Gabe von LPS allein.



**Abb.2:** Freisetzung von Thromboxan B<sub>2</sub> (A) und 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> (B) über 120 min in isoliert perfundierten Rattenlungen. Die Lungen wurden entweder als Kontrolle (n=13) ohne LPS und AT III perfundiert oder in Anwesenheit von 50 µg/ml LPS (n=11), 2 U/ml AT III (n=10), 5 U/ml AT III (n=13) bzw. 2 U/ml AT III und 50 µg/ml LPS (n=5). Das Gesamtvolumen des rezirkulierenden Perfusats betrug 80 ml. Die Bestimmung erfolgte mittels Radioimmunoassay (Angaben in pg/ml). Die Nachweisgrenze betrug 2,5 pg/Ansatz für TxB<sub>2</sub> und 3,2 pg/Ansatz für 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>. \*, p<0,05 versus Kontrolle.

### 4.2.3 Pulmonalvaskuläre Freisetzung von Big Endothelin-1 und Endothelin-1

Abb.3 zeigt die Konzentrationen von Big ET-1 und ET-1 im zirkulierenden Puffer: Die Kontrollungen sezernierten über 120 min  $15,2 \pm 4,5$  pg/ml Big ET-1 und  $0,46 \pm 0,13$  pg/ml ET-1. Nach Applikation von LPS stieg der ET-1-Spiegel auf das 1,6fache des Kontrollwertes ( $p < 0,05$ ), während die Werte für Big ET-1 unverändert blieben. Nach Gabe von 2 U/ml AT III stiegen die Konzentrationen von Big ET-1 und ET-1 auf das 1,7- bzw. 1,2fache (jeweils  $p < 0,05$ ). Auch 5 U/ml AT III führten zu signifikanten Anstiegen sowohl für Big ET-1 (1,6fach) als auch für ET-1 (1,3fach). Nach Applikation von 2 U/ml AT III und LPS erhöhte sich die Konzentration von Big ET-1 auf das 2,6fache, ein signifikant stärkerer Effekt als unter LPS oder AT III allein (jeweils  $p < 0,05$ ), während sich der Effekt auf die ET-1-Konzentration nicht von dem unter LPS oder AT III allein unterschied.



**Abb.3:** Freisetzung von Big ET-1 (A) und ET-1 (B) über 120 min in isoliert perfundierten Rattenlungen. Die Lungen wurden entweder als Kontrolle (n=13) ohne LPS und AT III perfundiert oder in

Anwesenheit von 50 µg/ml LPS (n=11), 2 U/ml AT III (n=10), 5 U/ml AT III (n=13) bzw. 2 U/ml AT III und 50 µg/ml LPS (n=5). Das Gesamtvolumen des rezirkulierenden Perfusats betrug 80 ml. Die Bestimmung erfolgte mittels Radioimmunoassay (Angaben in pg/ml). Die Nachweisgrenze betrug 2 pg/Ansatz für Big ET-1 und 0,15 pg/Ansatz für ET-1. \*, p<0,05 versus Kontrolle; #, p<0,05 versus LPS; §, p<0,05 versus AT III.

Diese Zwischenergebnisse zeigten, daß AT III die pulmonalvaskuläre Sekretion von Big ET-1 und ET-1 stimuliert, ohne die Prostanoidfreisetzung zu beeinflussen. Daher konzentrierten sich die weiteren Versuche auf folgende Fragestellungen:

Zunächst sollte der Einfluß von exogenem PGI<sub>2</sub> auf die beschriebene Stimulation der pulmonalvaskulären Big ET-1- und ET-1-Sekretion durch AT III untersucht werden. Die Bedeutung dieses Versuchsaufbaus leitet sich aus der bereits erwähnten Tatsache ab, daß in vivo nach Gabe von AT III eine Erhöhung der zirkulierenden PGI<sub>2</sub>-Spiegel vorliegt<sup>21</sup>, welche nach den hier beschriebenen Ergebnissen offensichtlich nichtpulmonalen Ursprungs ist, jedoch die pulmonale Big ET-1- und ET-1-Synthese beeinflussen könnte. Außerdem dienten die weiteren Versuche der Untersuchung der Mechanismen, die der Stimulation der pulmonalen Big ET-1- und ET-1-Freisetzung durch AT III zugrundeliegen.

## **5 Einfluß von Prostazyklin auf die durch Antithrombin III und LPS stimulierte Big Endothelin-1- und Endothelin-1-Freisetzung**

### **5.1 Protokoll**

Unter Beibehaltung des in 4 erläuterten Protokolls wurden folgende zusätzliche Versuchsgruppen gebildet und mit der unter 4 beschriebenen Kontrollgruppe sowie der Gruppe AT III + LPS verglichen:

1. *Cicaprost* (100nM), ein stabiles synthetisches Prostazyklinanalogon (n=6);
2. *Cicaprost* + *AT III* + *LPS*, in folgenden Konzentrationen: *Cicaprost* 100nM, *AT III* 2U/ml, *LPS* 50 µg/ml (n=6).

Das *Cicaprost* stammte von Schering AG (Berlin, Deutschland).

## **5.2 Ergebnisse**

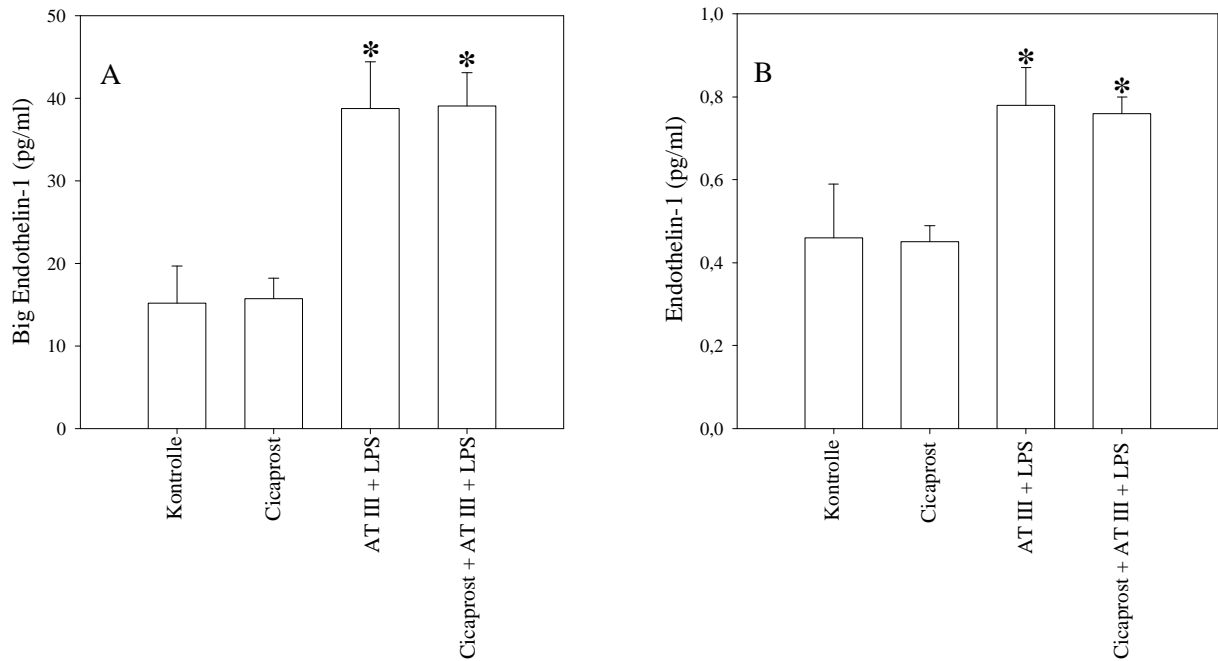
### **5.2.1 Pulmonale Hämodynamik**

Der mittlere pulmonalarterielle Druck blieb während des gesamten Experimentes unverändert und lag im Mittel aller Versuchsgruppen bei  $5,0 \pm 0,7$  mmHg. Es wurden weiterhin in keiner der Gruppen Änderungen des Gewichtes beobachtet.

### **5.2.2 Pulmonalvaskuläre Freisetzung von Big Endothelin-1 und Endothelin-1**

Die Gabe von *Cicaprost* veränderte weder die basale noch die LPS- und AT-III-stimulierte Freisetzung von Big ET-1 und ET-1.

Abb.4 zeigt die Konzentrationen von Big ET-1 und ET-1 im zirkulierenden Puffer.



**Abb.4:** Freisetzung von Big ET-1 (A) und ET-1 (B) über 120 min in isoliert perfundierten Rattenlungen. Die Lungen wurden zum einen als Kontrolle mit einem lediglich Hydroxylamin enthaltenden Puffer perfundiert (n=13). In weiteren Gruppen wurden folgende Pharmaka appliziert: 100 nM Cicaprost, ein stabiles synthetisches Prostazyklinanalogon (n=6); 2 U/ml AT III und 50 µg/ml LPS (n=5) sowie 2 U/ml AT III, 50 µg/ml LPS und 100 nM Cicaprost (n=6). Das Gesamtvolumen des rezirkulierenden Perfusats betrug 80 ml. Die Bestimmung erfolgte mittels Radioimmunoassay (Angaben in pg/ml). Die Nachweisgrenze betrug 2 pg/Ansatz für Big ET-1 und 0,15 pg/Ansatz für ET-1. \*, p<0,05 versus Kontrolle.

## 6 Mechanismen der Stimulation der Big-Endothelin-1- und Endothelin-1-Freisetzung durch Antithrombin III

### 6.1 Protokoll

Alle Versuche wurden in Anwesenheit von 5 U/ml AT III durchgeführt. Unter Beibehaltung des in 4 erläuterten Protokolls wurden außerdem folgende Pharmaka verabreicht:

1. *Nicardipin* (50  $\mu$ M), ein Blocker der L-Typ-Kalzium-Kanäle (n=7)<sup>85</sup>;
2. *Heparin* (50  $\mu$ g/ml), in einer Konzentration, die maximal die AT-III-induzierte PGI<sub>2</sub>-Freisetzung in endothelialen Zellkulturen inhibiert<sup>24</sup> (n=6);
3. *N-Azetyl-Heparin* (50  $\mu$ g/ml), ein Heparinderivat ohne Affinität zu AT III und demzufolge ohne antikoagulatorische Aktivität<sup>86</sup> (n=6);
4. *Staurosporin* (50 nM), ein Inhibitor der Proteinkinase C (PKC)<sup>87</sup> (n=8);
5. *Genistein* (100  $\mu$ M), ein Tyrosinkinaseinhibitor<sup>88</sup> (n=8).

Zusätzlich wurde die Pharmaka an Kontrollungen getestet (jeweils n=4), um ihre Eigeneffekte auf die pulmonale Freisetzung von Big-ET-1 und ET-1 zu dokumentieren.

Nicardipin, Heparin, N-Azetyl-Heparin, Staurosporin und Genistein stammten von Sigma Chemical (München, Deutschland).

## 6.2 Ergebnisse

### 6.2.1 Pulmonale Hämodynamik

Der mittlere pulmonalarterielle Druck lag während des gesamten Experimentes unverändert im Mittel aller Versuchsgruppen bei  $5,3 \pm 0,7$  mmHg. Weiterhin wurde in keiner der Gruppen eine für eine veränderte Permeabilität sprechende Gewichtsänderung beobachtet.

### 6.2.2 Effekte der Pharmaka auf die pulmonalvaskuläre Freisetzung von Big Endothelin-1 und Endothelin-1 in Abwesenheit von Antithrombin III

In Abwesenheit von AT III wurde keine signifikante Änderung der Freisetzung von Big ET-1 und ET-1 durch die Gabe von Nicardipin, Heparin, N-Azetyl-Heparin, Staurosporin und Genistein beobachtet. Somit besitzen diese Pharmaka in den angegebenen Konzentrationen keine Eigeneffekte auf die Sekretion von Big ET-1 und ET-1.

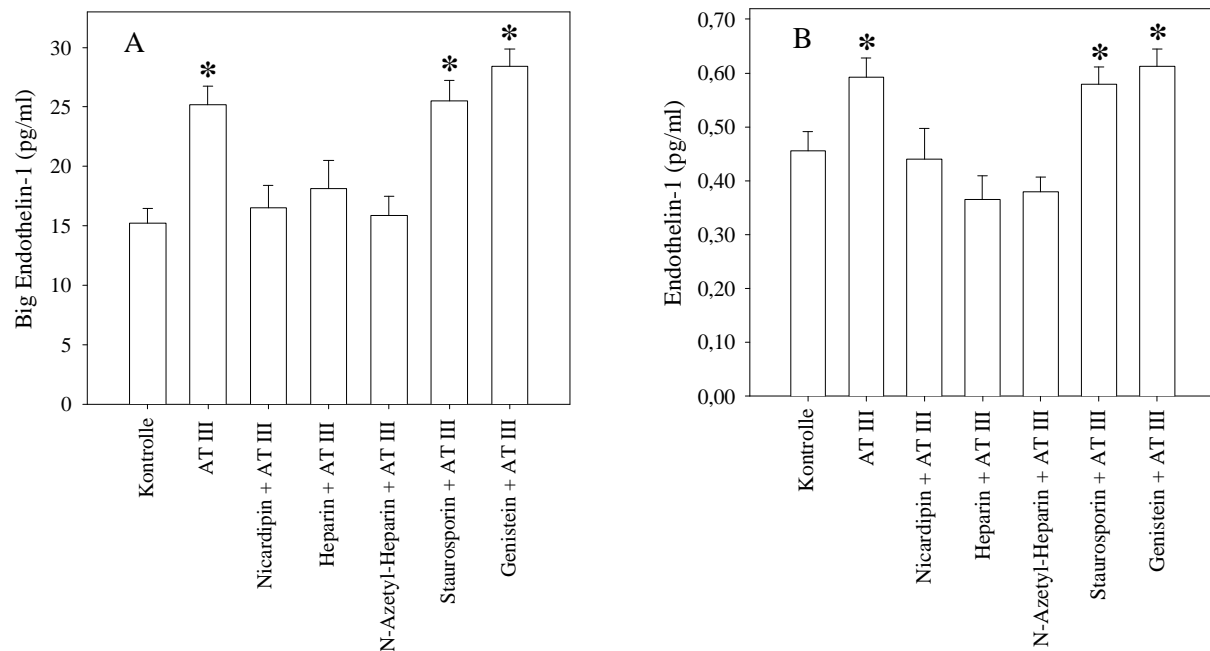
	Kontrolle	Nicardipin	Heparin	N-Azetyl-Heparin	Staurosporin	Genistein
<b>Big ET-1 (pg/ml)</b>	15,2±4,5	17,4±6,6	14,0±4,2	12,0±0,7	16,9±3,1	17,5±4,0
<b>ET-1 (pg/ml)</b>	0,46±0,13	0,42±0,07	0,38±0,08	0,38±0,04	0,50±0,08	0,51±0,12

**Tab.1:** Freisetzung von Big ET-1 und ET-1 über 120 min in isoliert perfundierten Rattenlungen. Die Perfusion erfolgte rezirkulierend mit 80 ml Puffer. Die Lungen wurden entweder als Kontrolle (n=13) oder in Anwesenheit von 50 µM Nicardipin, einem Blocker der L-Typ-Kalzium-Kanäle (n=4), 50 µg/ml Heparin (n=4), 50µg/ml N-Azetyl-Heparin, einem Heparinderivat ohne Affinität zu AT III (n=4), 50nM Staurosporin, einem Inhibitor der Proteinkinase C (n=4) bzw. 100µM Genistein, einem Tyrosinkinase-Inhibitor (n=4) perfundiert. Die Bestimmung erfolgte mittels Radioimmunoassay (Angaben in pg/ml). Die Nachweisgrenze betrug 2 pg/Ansatz für Big ET-1 und 0,15 pg/Ansatz für ET-1.

### 6.2.3 Effekte der Pharmaka auf den Antithrombin-III-induzierten Anstieg der Big Endothelin-1- und Endothelin-1-Konzentration

Abb.5 zeigt die Effekte der Pharmaka auf die AT-III-stimulierte pulmonalvaskuläre Freisetzung von Big ET-1(A) und ET-1(B).





**Abb.5:** Freisetzung von Big ET-1 (A) und ET-1 (B) über 120 min in isoliert perfundierten Rattenlungen. Die Lungen wurden entweder als Kontrolle (n=13) oder mit 5 U/ml AT III (n=13) perfundiert. Weiterhin wurden in Anwesenheit von 5 U/ml AT III folgende Pharmaka appliziert: 50  $\mu$ M Nicardipin, ein Blocker der L-Typ-Kalzium-Kanäle (n=7); 50  $\mu$ g/ml Heparin (n=6); 50  $\mu$ g/ml N-Azetyl-Heparin, ein Heparinderivat ohne Affinität zum AT III (n=6); 50 nM Staurosporin, ein Inhibitor der Proteinkinase C (n=8) und 100  $\mu$ M Genistein, ein Tyrosinkinase-Inhibitor (n=8). Das Gesamtvolumen des rezirkulierenden Perfusats betrug 80 ml. Die Bestimmung erfolgte mittels Radioimmunoassay (Angaben in pg/ml). Die Nachweisgrenze betrug 2 pg/Ansatz für Big ET-1 und 0,15 pg/Ansatz für ET-1. \*,  $p < 0,05$  versus Kontrolle.

Die durch AT III induzierte Stimulation der pulmonalvaskulären Freisetzung von Big ET-1 und ET-1 wurde durch Nicardipin, Heparin bzw. N-Azetyl-Heparin inhibiert. Im Gegensatz dazu beeinflussten weder Staurosporin noch Genistein den AT III-induzierten Anstieg der Big-ET-1- und ET-1-Konzentration.

## 7 Diskussion

### 7.1 Effekte von LPS auf die pulmonalvaskuläre Freisetzung von Thromboxan, Prostazyklin, Big Endothelin-1 und Endothelin-1 sowie die pulmonale Hämodynamik

Die pulmonalen hämodynamischen Verhältnisse und die vaskuläre Permeabilität wurden durch die Gabe von LPS nicht verändert. Dieses Ergebnis entspricht dem anderer Arbeiten, die keine relevanten Änderungen des pulmonalvaskulären Widerstandes und der Permeabilität nach LPS-Gabe in vivo<sup>16</sup> und in vitro<sup>82</sup> an *Ratten* zeigten. Im Gegensatz dazu reagieren Kaninchen<sup>3</sup>, Schafe<sup>89</sup>, Schweine<sup>17</sup> und Menschen<sup>7</sup> auf LPS mit einer Steigerung des pulmonalvaskulären Tonus. Daran scheint, wie von Snapper et al. demonstriert, die auch bei diesen Spezies erhöhte pulmonale ET-1-Synthese beteiligt zu sein<sup>89</sup>. Es ist bekannt, daß ET-1 ET<sub>B</sub>-vermittelt die Freisetzung von NO und PGI<sub>2</sub> stimuliert<sup>68,90</sup>. Die Balance zwischen der relaxierenden Wirkung dieser Substanzen und der konstringierenden Wirkung des ET-1 könnte bei der Ratte einen stabilisierenden Einfluß auf den pulmonalvaskulären Tonus haben, wie es in nichtpulmonalen Stromgebieten gezeigt werden konnte<sup>91</sup>. Die Konstanz der pulmonalen Hämodynamik nach LPS-Gabe stellt also eine Besonderheit der Spezies Ratte dar. Sie erweist sich jedoch für den Zweck der vorliegenden Arbeit, die Untersuchung der pulmonalvaskulären Mediatorveränderungen durch LPS und AT III, als vorteilhaft, da der pulmonalvaskuläre Druck als Einflußgröße konstant bleibt. Die funktionellen Auswirkungen der hier untersuchten Veränderungen können in jedem Fall nur am intakten Tier abgeschätzt werden.

Frühere Arbeiten zeigten eine verstärkte Freisetzung von TxA<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub> aus blutfrei perfundierten isolierten Lungen nach Gabe von Endotoxin oder bakteriellem Exotoxin<sup>3</sup>. Die vorliegende Arbeit bestätigt diese Ergebnisse und erweitert sie erstmals um die Quantifizierung der pulmonalvaskulären Freisetzung von ET-1 und seiner Vorstufe Big ET-1 unter basalen und septischen Bedingungen. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der ET-1-Freisetzung aus den mit LPS perfundierten

Lungen, der mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine gesteigerte Synthese des Peptids zurückzuführen ist, wie in-vivo-Studien anhand einer gesteigerten Prä-pro-ET-1-mRNA-Expression in septischen Rattenlungen zeigten<sup>16</sup>. Unklar ist, warum die Big-ET-1-Konzentration nicht signifikant steigt. Eine mögliche Erklärung ist eine erhöhte Expression und Aktivität des endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1), durch dessen proteolytische Wirkung Big-ET-1 in aktives ET-1 umgewandelt wird<sup>37</sup>. Dieser Effekt wurde bisher aber nur für nichtpulmonales Gewebe beschrieben<sup>92</sup>. Kürzlich konnte jedoch eine Steigerung der Expression der ECE-1-mRNA in Bronchialepithelzellen durch  $\text{TNF}_\alpha$  gezeigt werden<sup>93</sup>. In einer weiteren Arbeit wurde demonstriert, daß es in LPS-perfundierten Kaninchenlungen unmittelbar nach Gabe des Endotoxins zu einer Steigerung der pulmonalen  $\text{TNF}_\alpha$ -Freisetzung kommt<sup>94</sup>. Somit ist es denkbar, daß es während der vorliegenden Experimente auch zu einer Stimulation der ECE-1-Expression kam.

## **7.2 Effekte von AT III auf die pulmonalvaskuläre Freisetzung von Thromboxan, Prostazyklin, Big Endothelin-1 und Endothelin-1 unter septischen und nichtseptischen Bedingungen**

Die Gabe von AT III allein hatte keinen Einfluß auf die pulmonalvaskuläre Freisetzung von  $\text{TxA}_2$  und  $\text{PGI}_2$ . Auch in Kombination mit LPS hatte AT III keinen additiven Effekt auf die Prostanoidfreisetzung. Somit scheint es unwahrscheinlich, daß die Pulmonalstrombahn eine Rolle bei der in vivo beobachteten<sup>22</sup> Erhöhung der zirkulierenden  $\text{PGI}_2$ -Spiegel spielt. Dieses Ergebnis widerspricht keineswegs den Arbeiten anderer Autoren, da eine durch AT III stimulierte Freisetzung von  $\text{PGI}_2$  bisher lediglich an *nicht*pulmonalen Endothelzellen demonstriert wurde<sup>23,24</sup>.

Bisher existierten keine Untersuchungen darüber, inwieweit AT III die pulmonalvaskuläre Freisetzung von Big ET-1 bzw. ET-1 beeinflusst. Die Gabe von 2 U/ml bzw. 5 U/ml AT III erhöhte die Konzentrationen von ET-1 und insbesondere auch von Big ET-1 im Effluat unter nichtseptischen Bedingungen. Weiterhin hatte die Applikation von 2 U/ml AT III in Kombination mit LPS einen additiven Effekt auf die Freisetzung von Big ET-1<sup>95</sup>. Diese Befunde einer AT-III-induzierten Stimulation von

Big ET-1 und ET-1 sind möglicherweise von erheblicher pathophysiologischer Relevanz.

Zunächst ist Big ET-1 potentiell ebenso wirksam wie ET-1 selbst, da es in der systemischen Zirkulation<sup>96</sup> und im Lungengewebe<sup>97</sup> durch ECE in das reife Peptid umgewandelt werden kann. ET-1 seinerseits weist zahlreiche inflammationsfördernde Eigenschaften auf. Es führt, wie an Ratten gezeigt wurde, zu einer Aggregation von Neutrophilen und Thrombozyten in der pulmonalen Mikrozirkulation<sup>98</sup>. Es konnte demonstriert werden, daß ET-1 bei Anwesenheit von Leukozyten im Perfusat<sup>98,99</sup> selbst permeabilitätssteigernd wirkt<sup>100</sup> und außerdem die durch Leukozyten induzierte Lungenschädigung verstärkt<sup>101</sup>. Weiterhin regt ET-1 mononukleäre Zellen zu einer verstärkten Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine  $\text{TNF}_\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-8 an<sup>102</sup>. Für die pathophysiologische Relevanz der erhobenen Befunde ist weiterhin die Gefäßaktivität des ET-1 von Bedeutung. Bei Spezies, die im Verlauf eines ARDS eine Erhöhung des pulmonalvaskulären Widerstandes zeigen (z.B. Kaninchen<sup>3</sup>, Schafe<sup>89</sup>, Schweine<sup>17</sup>, Menschen<sup>7</sup>), kann dieser Effekt durch erhöhte Big-ET-1- oder ET-1-Konzentrationen weiter verstärkt werden, da diese Peptide vor allem in der Spätphase des ARDS wesentlich zur pulmonalen Vasokonstriktion beitragen<sup>89</sup>. Schließlich konnte - hinsichtlich weiterer Effekte der pulmonale Endotheline - gezeigt werden, daß pulmonales Big ET-1 sowohl unter basalen Bedingungen als auch im Zustand der akuten Lungenschädigung<sup>103,104</sup> eine vasokonstriktorische Wirkung auf die Koronarstrombahn hat. Obgleich diese Effekte durch die vaskuläre Hyporeagibilität bei Sepsis abgeschwächt sein können, liegt hierin ein weiterer potentieller Schädigungsmechanismus begründet. Dieser könnte zusätzliche Bedeutung erlangen, wenn AT III beim *nicht*septischen ARDS appliziert wird.

Es ist angesichts der zitierten Befunde kaum vorstellbar, daß die Stimulation der pulmonalvaskulären Big-ET-1- und ET-1-Freisetzung durch AT III zu den bekannten protektiven Effekten der Antiprotease am intakten Tier beiträgt<sup>22,84</sup>. Es ist vielmehr wahrscheinlicher, daß die protektive Wirkung des AT III durch die verstärkt sezernierten pulmonalen Endotheline abgeschwächt wird. Ausgehend von den vorliegenden Ergebnissen erscheint der Versuch der kombinierten Gabe von AT III und ET-Antagonisten im tierexperimentellen ARDS sinnvoll, um weitere wertvolle Informationen zu gewinnen. Als ET-Blocker kommen selektive  $\text{ET}_A$ - $\text{ET}_B$ - bzw.

unselektive ET-Rezeptor-Antagonisten, die teilweise schon in klinischen Studien untersucht werden<sup>105</sup>, sowie Hemmer des ECE in Frage<sup>106,107</sup>. Der pulmonale Gefäßwiderstand läßt sich bereits durch die Gabe von selektiven ET<sub>A</sub>-Rezeptor-Blockern wirksam senken, jedoch konnte die durch exogen zugeführtes ET-1 ausgelöste pulmonale Permeabilitätsstörung stärker durch einen nichtselektiven ET-Rezeptorantagonisten gehemmt werden<sup>105-107</sup>. Für den Versuch der kombinierten Gabe mit AT III kommt somit am ehesten ein nichtselektiver ET-Rezeptor-Blocker in Frage. Besondere Aufmerksamkeit gilt, wie bereits angeführt, der ET-1-Blockade bei *nicht*septischem ARDS, da hierbei die vasokonstriktorischen Effekte von Big ET-1 und ET-1 nicht durch eine vaskuläre Hyporeagibilität vermindert sind.

### **7.3 Mechanismen der Antithrombin III-induzierten Stimulation der pulmonalvaskulären Big Endothelin-1- und Endothelin-1-Freisetzung**

Da die Gabe von AT III keinen Einfluß auf die pulmonalvaskuläre PGI<sub>2</sub>-Freisetzung zeigte, ist anzunehmen, daß die in vivo beobachtete Erhöhung der PGI<sub>2</sub>-Plasmakonzentration<sup>22</sup> nichtpulmonalen Ursprungs ist. Um diese systemische, potentiell die ET-Freisetzung inhibierende<sup>26-29</sup> PGI<sub>2</sub>-Sekretion zu simulieren, wurde Cicaprost, ein stabiles synthetisches PGI<sub>2</sub>-Analogon, appliziert. Es konnte demonstriert werden, daß Cicaprost keinen Einfluß sowohl auf die basale als auch auf die durch 2 U/ml AT III und 50µg/ml LPS stimulierte Big ET-1- und ET-1-Freisetzung hat. Somit kann die von Razandi et al.<sup>29</sup> an bovinen aortalen Endothelzellen beobachtete Hemmung der ET-1-Sekretion durch PGI<sub>2</sub> an unserem Modell nicht bestätigt werden, was seine Ursache in Speziesunterschieden und der Betrachtung unterschiedlicher Gefäßregionen haben kann.

Im weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit die Mechanismen der oben beschriebenen AT-III-induzierten Steigerung der Big-ET-1- und ET-1-Freisetzung untersucht. Es zeigte sich, daß der Effekt des AT III durch die Blockade spannungsabhängiger L-Typ-Kalzium-Kanäle mit Nicardipin komplett inhibiert werden kann. Dieses Ergebnis entspricht dem bekannter Arbeiten, die einen stimulierenden Effekt des intrazellulären Kalziums auf die Synthese von ET-1 in

kultivierten Endothelzellen beschreiben<sup>85</sup>. Die Existenz spannungsabhängiger Kalzium-Kanäle in Endothelzellen ist umstritten. In einigen vorliegenden Studien an kultivierten Endothelzellen verschiedener Gefäßgebiete konnten keine spannungsabhängigen Kalzium-Kanäle nachgewiesen werden<sup>108,109</sup>. Die Freisetzung von ET-1 aus Endothelzellen sowohl der humanen Umbilikalarterie und -vene als auch der Aorta vom Schwein konnte jedoch durch Gabe von Nisoldipin bzw. Nimodipin, anderen Blockern der L-Typ-Kalzium-Kanäle, konzentrationsabhängig unterdrückt werden<sup>110,111</sup>, so daß von der Existenz dieser Ionenkanäle zumindest in bestimmten Gefäßgebieten ausgegangen werden muß. Die hier vorgelegten Daten machen deutlich, daß der stimulierende Effekt des AT III auf die pulmonalvaskuläre Big-ET-1- und ET-1-Freisetzung auch durch spannungsabhängige L-Typ-Kalzium-Kanäle vermittelt wird<sup>112</sup>.

Im Gegensatz zu Studien von Imai et al.<sup>113</sup> und Marsen et al.<sup>114</sup>, in denen eine Beteiligung der Proteinkinase C bzw. von Tyrosinkinasen bei der Regulation der ET-1-Synthese demonstriert wurde, konnten in dieser Arbeit keine Wirkungen des Proteinkinase C-Inhibitors Staurosporin und des Tyrosinkinase-Inhibitors Genistein auf die basale oder AT III-stimulierte Freisetzung von Big ET-1 und ET-1 dokumentiert werden. Zwar wurde in dieser Studie jeweils nur eine Konzentration des jeweiligen Pharmakons eingesetzt; dies erscheint jedoch als ein notwendiger Kompromiß angesichts der zahlreichen Nebenwirkungen von Staurosporin und Genistein. So blockiert Staurosporin die Proteinkinasen A ( $K_i=7$  nM) und G ( $K_i=8,5$  nM)<sup>87</sup> und Genistein L-Typ-Kalzium-Kanäle ( $IC_{50}=50$   $\mu$ M)<sup>115</sup>. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß die genutzten Konzentrationen (Staurosporin 50 nM, Genistein 100  $\mu$ M) die Signaltransduktion über die Proteinkinase C bzw. Tyrosinkinasen nicht wirksam inhibieren, weil die beobachteten Affinitäten für Staurosporin und Genistein im unteren nanomolaren ( $K_i=0,7$  nM)<sup>87</sup> bzw. im mikromolaren ( $IC_{50}=10-20$   $\mu$ M)<sup>88</sup> Bereich liegen. Speziesunterschiede sowie die Nutzung unterschiedlicher Gefäßgebiete und Modelle (intaktes Organ versus kultivierte Zellen) erklären möglicherweise die divergierenden Beobachtungen bezüglich des Einflusses der PKC bzw. von Tyrosinkinasen.

Heparin und sein Derivat N-Azetil-Heparin, das keine Affinität zu AT III und somit keine antikoagulatorische Aktivität besitzt, beeinflussten die basale pulmonalvaskuläre Sekretion von Big ET-1 und ET-1 nicht, blockierten jedoch den

AT-III-induzierten Konzentrationanstieg beider Peptide vollständig. Es ist allgemein anerkannt, daß AT III über endotheliale heparinähnliche Glykosaminoglykanrezeptoren wirkt, da es seine Wirkung bei Verwendung von modifiziertem AT III, das nicht an Glykosaminoglykanrezeptoren binden kann, nicht entfaltet<sup>22</sup>. Für die Effekte des AT III scheint somit die Bindung an Glykosaminoglykanrezeptoren essentiell zu sein. Durch die Verwendung von Heparin und N-Azetyl-Heparin sollte die Frage geklärt werden, ob Heparin seine inhibitorische Wirkung über die Konkurrenz mit den Glykosaminoglykanrezeptoren um AT III oder über eine Beeinflussung der intrazellulären Signaltransduktionswege des AT III ausübt. Daß im Ergebnis der AT-III-Effekt in gleicher Weise von AT-III-bindendem und nicht-AT-III-bindendem Heparin geblockt wurde, spricht für die zweite Variante<sup>112</sup>. Heparin scheint also eher mit der intrazellulären Signalübertragung als mit der Rezeptorbindung des AT III zu interagieren. Es ist von Heparin bekannt, daß es als Rezeptorblocker des Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) wirkt<sup>116</sup> und die von  $IP_3$  induzierte bzw. mediierte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration verhindert<sup>117,118</sup>. Die  $IP_3$ -Rezeptoren und somit der Wirkort des Heparins sind jedoch intrazellulär lokalisiert. Bei den angeführten Studien<sup>116-118</sup> mußte die Zellmembran stets permeabilisiert bzw. das Heparin mit einer Mikroinjektion in die Zelle appliziert werden. In der vorliegenden Arbeit erscheint es aufgrund der Größe und der Ladung des Heparinmoleküls und der offenbar nicht gestörten pulmonalvaskulären Permeabilität unwahrscheinlich, daß das applizierte Heparin die Endothelzellmembran penetrieren konnte. Es gelang jedoch einer anderen Arbeitsgruppe kürzlich, einen endothelialen Heparinrezeptor nachzuweisen und zu sequenzieren<sup>119,120</sup> sowie zu zeigen, daß Heparin und somit vermutlich auch das nicht-AT III-bindende N-Azetyl-Heparin Endothelzellen zur Produktion von Heparansulfat stimuliert<sup>121</sup>. Dieses heparinähnliche Glykosaminoglykan unterscheidet sich vom Heparin lediglich durch eine geringere Sulfatierung der Hyaluronsäurereste. Es konnte jedoch weiterhin eine verstärkte Sulfatierung eben dieser Hyaluronsäurereste des unter Heparinstimulation produzierten Heparansulfats festgestellt werden<sup>121</sup>. Es erscheint somit möglich, daß dieses Heparinderivat nunmehr intrazellulär die  $IP_3$ -Rezeptoren blockiert und damit die Wirkung des  $IP_3$  auf die Kalziumfreisetzung antagonisiert. Damit würden sowohl Nicardipin als auch die Heparine ihre inhibitorische Wirkung auf die AT III-induzierte Stimulation der Big ET-1- und ET-1-Freisetzung über eine Modulation der intrazellulären Kalziumkonzentration entfalten.

## 8 Zusammenfassung

Diese Arbeit sollte klären, ob die pulmonalprotektiven Effekte von AT III bei LPS-induziertem ARDS<sup>21,22</sup> auch auf einer Stimulation der pulmonalvaskulären PGI<sub>2</sub>-Freisetzung beruhen. Weiterhin sollte die Freisetzung von Big ET-1 und ET-1 unter septischen Bedingungen quantifiziert sowie mögliche Effekte von AT III auf diese Freisetzung untersucht werden. Dabei wurde das Modell der isolierten Rattenlunge verwendet.

Die Perfusion der Lunge mit LPS führte zu einer Steigerung der Konzentration von 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>, dem stabilen Metaboliten von PGI<sub>2</sub>, auf das 1,6fache und der Konzentration von TxB<sub>2</sub>, dem stabilen Metaboliten von TxA<sub>2</sub>, auf das 2,9fache gegenüber der Kontrollgruppe. Die Konzentration von ET-1 erhöhte sich unter LPS auf das 1,6fache, während der Big ET-1 Spiegel konstant blieb. Sowohl die Gabe von 2 U/ml AT III als auch von 5 U/ml AT III hatte keinen Effekt auf die Freisetzung von PGI<sub>2</sub> und TxA<sub>2</sub>. Die kombinierte Gabe von LPS und AT III wirkte ebenso wie die Gabe von LPS allein. Die Konzentrationen von Big ET-1 und ET-1 erhöhten sich unter 2 U/ml AT III auf das 1,7- bzw. 1,2fache und unter 5 U/ml AT III auf das 1,6- bzw. 1,3fache gegenüber den Kontrollen. Die kombinierte Gabe von LPS und AT III führte zu einem signifikant höheren Big ET-1-Spiegel vom 2,6fachen des Basalwertes, während sich die Konzentration von ET-1 nicht von der unter LPS bzw. AT III allein unterschied.

Die Gabe von Cicaprost, einem stabilen synthetischen PGI<sub>2</sub>-Analogon, beeinflusste weder die basale noch die durch 2 U/ml AT III und 50 µg/ml LPS stimulierte Big-ET-1- und ET-1-Freisetzung.

Die Applikation von Nicardipin, einem Blocker der L-Typ-Kalzium-Kanäle, antagonisierte den stimulierenden Effekt von AT III auf die Big-ET-1- und ET-1-Freisetzung komplett. Auch die Gabe von Heparin und von N-Azetyl-Heparin, einem nicht an AT III bindenden Heparinderivat, verhinderte diesen AT-III-Effekt vollständig. Dagegen hatte weder die Gabe von Staurosporin, einem Proteinkinase C-Inhibitor, noch von Genistein, einem Tyrosinkinase-Inhibitor, einen Effekt auf die durch AT III stimulierte Big-ET-1- und ET-1-Freisetzung.



Die pulmonalen hämodynamischen Verhältnisse blieben in allen Gruppen während des gesamten Experimentes konstant.

Diese Ergebnisse legen zum einen den Schluß nahe, daß das für den protektiven Effekt des AT III bei septischem ARDS verantwortlich gemachte PGI<sub>2</sub> nichtpulmonalen Ursprungs ist. Eine PGI<sub>2</sub>-medierte Hemmung der pulmonalen ET-1-Sekretion konnte an unserem Modell ausgeschlossen werden und scheint somit nicht am protektiven Effekt des AT III beim septischen ARDS beteiligt zu sein. Der beobachtete stimulierende Effekt des AT III auf die Freisetzung der pulmonalen Endotheline ist von möglicher pathophysiologischer Relevanz, da er die erwähnte protektive Wirkung des AT III mit hoher Wahrscheinlichkeit abschwächt. Dieser stimulierende Effekt des AT III scheint dabei an der intakten Rattenlunge weder von der Proteinkinase C noch von Tyrosinkinase vermittelt zu sein. Weiterhin ist festzustellen, daß die stimulierende Wirkung des AT III auf die pulmonalvaskuläre Freisetzung von Big ET-1 und ET-1 von einem Kalziumeinstrom durch L-Typ-Kalzium-Kanäle und damit von der intrazellulären Kalziumkonzentration abhängig ist. Wie die gleiche Wirksamkeit von Heparin und N-Azetyl-Heparin zeigt, erfordert die Blockade des AT-III-Effektes durch die Heparine keine direkte Bindung an AT III, was auf die zusätzliche Rolle der intrazellulären Kalziumfreisetzung über IP<sub>3</sub> hinweist.

## Literatur

1. Voelkel NF. The adult respiratory distress syndrome. *Klin Wschr.* 1989; 67: 559.
2. Walmrath D, Grimminger F, Lasch HG, Seeger W. Sepsis und das akute Lungenversagen – eine mögliche Rolle bakterieller Exotoxine. *medwelt.* 1993; 44: 23-32.

3. Walmrath D, Griebner M, Kolb B, Grimminger F, Galanos C, Schade U, Seeger W. Endotoxin primes perfused rabbit lungs for enhanced vasoconstrictor response to staphylococcal  $\alpha$ -toxin. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 148: 1179-86.
4. Fowler AA, Hamman RF, Zerbe GO, Benson K, Hyers TM. Adult respiratory distress syndrom. Prognosis after onset. *Am Rev Respir Dis*. 1985; 132: 472-78.
5. Montgomery AB, Stager MA, Carrico CJ, Hudson LD. Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrom. *Am Rev Respir Dis*. 1985; 132: 485-89.
6. Petty TL. Indicators of risk, course, and prognosis in adult respiratory distress syndrom (ARDS). *Am Rev Respir Dis*. 1985; 132: 471-72.
7. Druml W, Stelzner H, Waldhäusl W, Lenz K, Hammerle A, Vierhapper H, Gasic S, Wagner OF. Endothelin-1 in adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 148: 1169-73.
8. Dantzker DR, Brook CJ, Dehart P, Lynch JP, Weg JG. Ventilation-perfusion distributions in the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1979; 120: 1039-52.
9. Ralph DD, Robertson HAT, Weaver LJ, Hlastala MP, Carrico CJ, Hudson LD. Distribution of ventilation and perfusion during positive end-expiratory pressure in the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1985; 131: 54-60.
10. Quirnbach G, Müller S. *Medizinische Mikrobiologie* 8.Auflage. Chapman&Hall Weinheim. 1995; 3-4.
11. Zetkin M, Schaldach H. *Wörterbuch der Medizin* 15.Auflage. Ullstein Mosby Berlin. 1992; 1252.
12. Brigham KL, Meyrick B. Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis*. 1977; 133: 913-27.

13. Brigham KL, Meyrick B. Interactions of granulocytes with the lung. *Circ Res*. 1984; 54: 623-35.
14. Kelley J. State of the art: Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis*. 1990; 141: 765-88.
15. Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and polymorphnuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis*. 1990; 141: 471-501.
16. Curzen NP, Kaddoura S, Griffith MJD, Evans TW. Endothelin-1 in rat endotoxemia: mRNA expression and vasoreactivity in pulmonary and systemic circulations. *Am J Physiol*. 1997; 41: H2353-60.
17. Weitzberg E, Hemsén A, Rudehill A, Modin A, Wanacek M, Lundberg JM. Bosentan-improved cardiopulmonary vascular performance and increased plasma levels of endothelin-1 in porcine endotoxin shock. *Br J Pharmacol*. 1996; 118: 617-26.
18. Nakamura T, Kasai K, Sekiguchi Y, Banba N, Takahashi K, Emoto T, Hattori Y, Shimoda S. Elevation of plasma endothelin concentrations during endotoxin shock in dogs. *Eur J Pharmacol*. 1991; 205: 277-82.
19. Voerman HJ, Stehouwer CD, Van Kamp GJ, Strack van Schijndel RJ, Groenefeld AB, And Thijs LG. Plasma endothelin levels are increased during septic shock. *Crit Care Med*. 1992; 20: 1097-101.
20. Lundblad R, Giercksky KE. Endothelin-concentrations in experimental sepsis: profiles of big-endothelin and endothelin 1-21 in lethal peritonitis in rats. *Eur J Surg*. 1995; 161(1): 9-16.
21. Okajima K. New therapeutic implications of antithrombin III replacement in disseminated intravascular coagulation and multiple organ failure. *Intensivmed*. 1996; 33: 5-11.
22. Uchiba M, Okajima K, Murakami K, Okabe H, Takatsuki K. Attenuation of endotoxin-induced vascular injury by antithrombin III. *Am J Physiol*. 1996; 270: L921-30.

23. Horie S, Ishii H, Kazama M. Heparin-like glucosaminoglycan is a receptor for antithrombin III-dependent prostacyclin production in human endothelial cells. *Thromb Res.* 1990; 59: 895-904.
24. Yamauchi T, Umeda F, Inoguchi T, Nawata H. Antithrombin III stimulates prostacyclin production by cultured aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm.* 1989; 29: 1404-11.
25. Kainoh M, Imai R, Umetsu T, Hattori M, Nishio S. Prostacyclin and beraprost sodium as suppressor of activated rat polymorphnuclear leucocytes. *Biochem Pharmacol.* 1990; 38: 477-84.
26. Eisenhut T, Sinha B, Grottrup-Wolfers E, Semmler J, Siess W, Endres S. Prostacyclin analogs suppress the synthesis of tumor necrosis factor- $\alpha$  in LPS-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. *Immunopharmacology.* 1993; 26: 259-64.
27. Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: Molecular Biology, Biochemistry, Pharmacology, Physiology, and Pathophysiology. *Pharmacological Reviews.* 1994; 46(3): 325-415.
28. Marsden PA, Brenner BM. Transcriptional regulation of the endothelin 1 gene by TNF alpha. *Am J Physiol.* 1992; 262: C854-61.
29. Razandi M, Pedram A, Rubin T. PGE<sub>2</sub> and PGI<sub>2</sub> inhibit ET-1 secretion from endothelial cells by stimulating particulate guanylate cyclase. *Am J Physiol.* 1996; 270: H1243-9.
30. <http://www.dadachemestry.com/clinicalhtm/antithro.htm>, 3/4/98
31. <http://attila.stevens-tech.edu/~caymes/thrombin.hzm>, 3/10/98
32. Takeya H, Gabazza EC, Deguchi H, Suzuki K. Receptor for thrombin-antithrombin III complex. <http://www.medic.mie-u.ac.jp/posters/DM0413/DM0413.html>

33. Karlson P. *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler* 13.Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York. 1988; 435-6.
34. Siegenthaler W, Kaufmann W, Hornbostel H, Waller HD. *Lehrbuch der Inneren Medizin* 3.Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York. 1992; 216.
35. ebenda. 759-60.
36. Hickey KA, Rubanyi GM, Paul R, Highsmith RF. Characterization of a coronary vaso-constrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol.* 1985; 248: C550-6.
37. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988; 332: 411-5.
38. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86: 2863-7.
39. Shimada K, Takahashi M, Ikeda M, Tanzawa K. Identification and characterization of two isoforms of endothelin-converting enzyme-1. *FEBS Lett.* 1995; 371: 140-4.
40. Schweizer A, Valdenaire O, Nelbock P, Deuschle U, Dumas-Milne-Edwards JB, Stumpf JG, Löffler BM. Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochem J.* 1997; 328(Pt3): 871-7.
41. Emoto N, Yanagisawa M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem.* 1995; 270: 15262-68.
42. Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med.* 1995; 333(6): 356-63.

43. Takeda Y, Itoh Y, Yoneda T, Miyamori I, Takeda R. Cyclosporine A induces endothelin-1 release from cultured rat vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 1993; 233: 299-301.
44. Nunez DJR, Brown MJ, Davenport AP, Neylon CB, Schofield JP, Wye RK. Endothelin-1 mRNA is widely expressed in porcine and human tissue. *J Clin Invest.* 1990; 85: 1537-41.
45. Bloch KD, Eddy RL, Shoes TB, Quertermous T. cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin-3. *J Biol Chem.* 1989; 264: 18156-61.
46. Bakris GL, Fairbanks R, Traish M. Arginine vasopressin stimulates human mesangial cell production of endothelin. *J Clin Invest.* 1991; 87: 1158-64.
47. Russell FD, Skepper JN, Davenport AP. Human endothelial cells storage granules: a novel intracellular site for isoforms of the endothelial-converting enzym. *Circ Res.* 1998; 83(3): 314-21.
48. Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide and regulation of expression. *J Biol Chem.* 1989; 264: 14954-9.
49. De Nucci G, Thomas R, D'Orlean-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, Vane JR. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85: 9797-800.
50. Dupuis J, Stewart DJ, Cernacek P, Gosselin G. Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. *Circulation.* 1996; 94(7): 1578-84.
51. Sofia M, Faraone S, Alifano M, Micco A, Albisinni R, Maniscalco M, Di-Minno G. Endothelin abnormalities in patients with pulmonary embolism. *Chest.* 1997; 111(3): 544-9.

52. Highsmith RF, Blackburn K, Schmidt DJ. Endothelin and calcium dynamics in vascular smooth muscle. *Ann Rev Physiol.* 1992; 54: 257-77.
53. Yoshimoto S, Ishizaki Y, Sazaki T, Murota SI. Effects of carbon dioxide and oxygen in endothelin production by cultured porcine cerebral endothelial cells. *Stroke.* 1991; 22: 378-83.
54. Bolger GT, Liard F, Krogsrud R, Thibeault D, Jaramillo J. Tissue specificity of endothelin binding sites. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1990; 16: 367-75.
55. Tamirisa P, Frishman WH, Kumar A. Endothelin and endothelin antagonism: Roles in cardiovascular health and disease. *Am Heart J.* 1995; 130: 601-10.
56. Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ET<sub>C</sub> receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem.* 1993; 268: 19126-33.
57. Douglas SA, Ohlstein EH. Signal transduction mechanisms mediating the vascular actions of endothelin. *J Vasc Res.* 1997; 34: 152-64.
58. Simonson MS, Dunn MJ. Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J.* 1990; 4: 2989-3000.
59. Aramori I, Nakanishi S. Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1992; 267: 12468-74.
60. Koh E, Morimoto S, Kim S, Nabata T, Miyashita Y, Ohihara T. Endothelin stimulates Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in vascular smooth muscle cells. *Biochem Int.* 1990; 20: 375-80.
61. Warner TD, Allcock GH, Mickley EJ, Corder R, Vane JR. Comparative studies with endothelin receptor antagonists BQ-123 and PD 142893 indicate at least three endothelin receptors. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989; 22(suppl 8): 117-20.

62. Douglas SA, Beck GR Jr, Elliott JD, Ohlstein EH. Pharmacological evidence for the presence of three distinct functional endothelin receptor subtypes in the rabbit lateral saphenous vein. *Br J Pharmacol*. 1995; 114: 1529-40.
63. Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T, Shinimi O, Sugita Y, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T. Conversion of big endothelin-1 to 21-residue endothelin-1 is essential expression of full vasoconstrictor activity: structure activity relationships of big endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1989; 13(suppl 5): 5-7.
64. Hemsén A, Ahlborg G, Ottosson-Seeberger A, Lundberg JM. Metabolism of big endothelin-1 (1-38) and (22-28) in the human circulation in relation of production of endothelin (1-21). *Regul Pept*. 1995; 55: 287-97.
65. Hemsén A, Pernow J, Lundberg JM. Regional extraction of endothelins and conversion of big endothelin to endothelin-1 in the pig. *Acta Physiol Scand*. 1991; 141: 325-34.
66. Neuser D, Steinke W, Dellweg H, Kazda S, Stasch JP. 125I-endothelin-1 125I-big endothelin-1 in rat tissues: autoradiographic localization and receptor binding. *Histochemistry*. 1991; 95: 621-8.
67. Rossi GP, Albertin G, Franchin E, Sacchetto A, Cesari M, Palu G, Pessina AC. Expression of the endothelin-converting enzyme gene in human tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 211: 249-53.
68. Noll G, Wenzel RR, Lüscher TF. Endothelin and endothelin antagonists: Potential role in cardiovascular and renal disease. *Mol Cell Biochem*. 1996; 157: 259-67.
69. Cocks TM, Broughten A, Dib M, Sudhir K, Angus JA. Endothelin is blood vessel selective: studies of a variety of human and dog vessels in vitro and regional blood flow in conscious rabbit. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1989; 16: 243-6.



70. Ushio-Fukai M, Nishimura J, Aoki H, Kobayashi S, Kanaide H. Endothelin-1 inhibits and enhances contraction of porcine coronary arterial strips with an intact endothelium. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 184: 518-24.
71. Schmeck J, Koch T. Die Bedeutung von Endothelin für physiologische und pathophysiologische Prozesse der Lunge. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 1997; 32: 401-8.
72. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Path FRC, Stewart DJ. Expression of endothelin-1 in lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 1993; 328: 1732-39.
73. Kohan DE, Padilla E. Osmolar regulation of endothelin-1 production by rat inner medullary collecting duct. *J Clin Invest.* 1993; 91: 1235-40.
74. Endo T, Uchida Y, Matsumoto H, Suzuki N, Nomura A, Hirata F, Hasegawa S. Regulation of endothelin-1 synthesis in cultured guinea pig airway epithelial cells by various cytokines. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 186: 1594-99.
75. Mattoli S, Mezetti M, Riva G, Allegra L, Fasoli A. Specific binding of endothelin on human bronchial smooth muscle cells in culture and secretion of endothelin-like material from bronchial epithelial cells. *Am J Resp Cell Mol Biol.* 1990; 3: 145-51.
76. Ehrenreich H, Anderson RW, Fox CH, Rieckmann P, Hoffman GS, Travis WD, Coligan JE, Kehrl JH, Fauci AS. Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *J Exp Med.* 1990; 172: 1741-8.
77. Mann J, Farrukh IS, Michael JR. Mechanisms by which endothelin-1 induces pulmonary vasoconstriction in the rabbit. *J Appl Physiol.* 1991; 71: 410-6.
78. Candenas ML, Naline E, Sarria B, Advenier C. Effects of epithelium removal and of enkephalin inhibition on the bronchoconstrictor response to three endothelins of the human isolated bronchus. *Eur J Pharmacol.* 1992; 210: 291-7.

79. Millul V, Lagente V, Gillardeaux O, Boichot E, Dugas B, Mecia-Heurta JH, Bereziat G, Braquet P, Masliah J. Activation of guinea pig alveolar macrophages by endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991; 17(Suppl 7): 233-5.
80. Schrör K, Seidel H. Blood-vessel wall arachidonate metabolism and its pharmacological modification in a new in vitro system. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1988; 337: 177-82.
81. Bortz J, Lienert GA, Boehnke K. Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik. *Springer, Berlin.* 1990.
82. Uhlig S, Brasch F, Wollin L, Fehrenbach H, Richter J, Wendel A. Functional and fine structural changes in isolated rat lungs challenged with endotoxin ex vivo and in vitro. *Am J Pathol.* 1995; 146: 1235-47.
83. Fourier F, Chopin C, Huart JJ, Runge I, Caron C, Goudemand J. Double-blind, placebo-controlled trial of antithrombin III concentrates in septic shock with disseminated intravascular coagulation. *Chest.* 1993; 104: 882-8.
84. Dickneite G, Paques EP. Reduction of mortality with antithrombin III in septicemic rats: a study of *Klebsiella pneumoniae* induced sepsis. *Thromb Haemostas.* 1993; 69: 98-102.
85. Brunner F. Dependence of endothelin-1 secretion on  $Ca^{2+}$ . *Biochem Pharmacol.* 1995; 49: 1785-91.
86. Friedrichs GS, Kilgore KS, Maley PJ, Gralinski MR, Luccesi MR. Effects of heparin and N-acetyl heparin on ischemia/reperfusion-induced alterations in myocardial function in the rabbit isolated heart. *Circ Res.* 1994; 75: 701-10.
87. Matsumoto H, Sasaki Y. Staurosporin, a protein kinase C inhibitor, interferes with proliferation of arterial smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 158: 105-9.

88. Dean NM, Kanemitsu M, Boynton AL. Effects of the tyrosine-kinase inhibitor genistein on DANN synthesis and phospholipid-derived second messenger generation in mouse 10T1/2 fibroblasts and in rat liver T51B cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 165: 795-801.
89. Snapper JR, Thabes JS, Lefferts PL, Lu WX. Role of endothelin in endotoxin-induced sustained pulmonary hypertension in sheep. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157: 81-8.
90. Ortega-Mateo A, de-Artinano AA. Highlights on endothelins: a review. *Pharmacol-Res.* 1997; 36(5): 339-51.
91. Ahlborg G, Lundberg JM. Cyclooxygenase inhibition potentiates the renal vascular response to endothelin-1 in humans. *J-Appl-Physiol.* 1998; 85(5): 1661-6.
92. Guo Y, Cernacek P, Giaid A, Hussain SN. Production of endothelins by the ventilatory muscles in septic shock. *Am-J-Respir-Cell-Mol-Biol.* 1998; 19(3): 470-6.
93. Saleh D, Furukawa K, Tsao S, Maghazachi A, Corrin B, Yanagisawa M, Barnes PJ, Giaid A. Elevated expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 in idiopathic pulmonary fibrosis: possible role of proinflammatory cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997; 16: 187-93.
94. Ghofrani HA, Rosseau S, Walmrath D, Kaddus W, Kramer A, Grimminger F, Lohmeyer J, Seeger W. Compartmentalized lung cytokin release in response to intravascular and alveolar endotoxin challenge. *Am J Physiol.* 1996; 270: L62-8.
95. Dschietzig T, Alexiou K, Laule M, Becker R, Schroer K, Baumann G, Brunner F, Stangl K. Effect of Antithrombin III on the release of prostanoids and endothelins in isolated rat lungs under basal and septic conditions. *Crit Care Med.* 2000; 28: 2445-9.

96. Corder R, Vane JR. Radioimmunoassay evidence that the pressor effect of big endothelin-1 is due to local conversion to endothelin-1. *Biochem Pharmacol.* 1995; 49: 375-80.
97. Hisaki K, Matsumura Y, Maekawa H, Fujita K, Takaoka M, Morimoto S. Conversion of big ET-1 in the rat lung: role of phosphoramidon-sensitive endothelin-1-converting enzyme. *Am J Physiol.* 1994; 266: H422-8.
98. Helset E, Lindal S, Olsen R, Myklebust R, Jorgensen L. Endothelin-1 causes sequential trapping of platelets and neutrophils in pulmonary microcirculation in rats. *Am J Physiol.* 1996; 271: L538-46.
99. Helset E, Ytrehus K, Tveita T, Kjaeve J, Jorgensen L. Endothelin-1 causes accumulation of leucocytes in pulmonary circulation. *Circ Shock.* 1994; 44(4): 201-9.
100. Kurose I, Miura S, Fukumura D, Tsuchiya M. Mechanism of endothelin-induced macromolecular leakage in microvascular beds of rat mesentery. *Eur J Pharmacol.* 1993; 250: 85-90.
101. Ishizaki T, Shigimori K, Nakai T, Miyabo S, Hayakawa M, Ozawa T, Voelkel NF, Chang SW. Endothelin-1 potentiates leukotoxin-induced edematous lung injury. *J Appl Physiol.* 1995; 79: 1106-11.
102. Cunningham ME, Huribal M, Bala RJ, McMillen MA. Endothelin-1 and endothelin-4 stimulate monocyte production of cytokines. *Crit Care Med.* 1997; 25: 958-64.
103. Stangl K, Dschietzig T, Laule M, Alexiou K, Wernecke KD, Baumann G. Pulmonary big endothelin affects coronary tone and leads to enhanced ET<sub>A</sub>-mediated coronary constriction in early endothelial dysfunction. *Circulation.* 1997; 96: 3192-200.
104. Dschietzig T, Laule M, Alexiou K, Schrör K, Baumann G, Stangl K. Coronary constriction and consequent cardiodepression in pulmonary embolism are mediated by pulmonary big endothelin and enhanced in early endothelial dysfunction. *Crit Care Med.* 1998; 26: 510-7.

105. Bornkessel B. Endothelinrezeptor-Antagonisten. *MMP*. 1997; 7: 174-6.
106. Filep JG. Endothelin receptor antagonists: new perspectives in endothelin research. *Drugs Today*. 1995; 31: 155-71.
107. Kaddoura S, Poole-Wilson PA. Endothelin-1 in heart failure: a new therapeutic target? *Lancet*. 1996; 348: 418-9.
108. Ikeda H, Kubo N, Nakamura A, Harada N, Yamashita T. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization in cultured human mucosal microvascular endothelial cells from the nasal inferior turbinate. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 1996; 58(6): 320-5.
109. van Bremen C, Skarsgard P, Laher I, McManus B, Wang X. Endothelium-smooth muscle interactions in blood vessels. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1997; 24(12): 989-92.
110. Liu JJ, Casley D, Wojta J, Gallicchio M, Dauer R, Buxton BF, Johnston CI. Reduction of endothelin levels by the dihydropyridine calcium antagonist nisoldipine and a natural factor in cultured human endothelial cells. *J Hypertens*. 1993; 11: 977-982.
111. Chen TH, Tseng HP, Yang YJ, Mao SJ. Effect of antioxidant in endothelial cells exposed to oxidized low-density lipoproteins. *Life-Sci*. 1998; 62(19): PL277-82.
112. Stangl K, Dschietzig T, Alexiou K, Brunner F. Antithrombin increases pulmonary endothelins: inhibition by heparin and  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonism. *Eur J Pharmacol*. 1999; 370(1): 57-61.
113. Imai T, Hirata Y, Emori T, Marumo F. Heparin has an inhibitory effect on endothelin-1 synthesis and release by endothelial cells. *Hypertension*. 1993; 21: 353-358.
114. Marsen TA, Simonson MS, Dunn MJ. Thrombin induces the preproendothelin-1 gene in endothelial cells by a protein tyrosine kinase-linked mechanism. *Circ Res*. 1995; 76: 987-995.

115. Kusaka M, Sperelakis N. Inhibition of L-type calcium current by genistein, a tyrosine kinase inhibitor, in pregnant rat myometrial cells. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1240: 196-200.
116. Molnar M, Hertelendy F. Signal transduction in rat myometrial cells: comparisons of the actions of endothelin-1, oxytocin and prostaglandin F2 alpha. *Eur J Endocrinol*. 1995; 133(4): 467-74.
117. Mathias RS, Mikoshiba K, Michikawa T, Miyawaki A, Ives HE. IP3 receptor blockade fails to prevent intracellular Ca<sup>2+</sup> release by ET-1 and alpha-thrombin. *Am J Physiol*. 1998; 274: C1456-65.
118. Zhang W, Sarosi G Jr, Barnhart D, Yuli DI, Mulholland MW. Endothelin-activated calcium signal in enteric glia derived from neonatal guinea pig. *Am J Physiol*. 1997; 272: G1175-85.
119. Liu S, Smith SE, Julien J, Rohde LH, Karin NJ, Carson DD. cDNA cloning and expression of HIP, a novel cell surface heparan sulfate/heparin-binding protein of human uterine epithelial cells and cell lines. *J Biol Chem*. 1996; 271(20): 11817-23.
120. Liu S, Julien J, Carson DD. A peptide sequence of heparin/heparan sulfate (HP/HS) interacting protein supports selective, high affinity binding of HP/HS and cell attachment. *J Biol Chem*. 1998; 273(16): 9718-26.
121. Pinhal MA, Santos IA, Silva IF, Dietrich CP, Nader HB. Minimum fragments of the heparin molecule able to produce the accumulation and change of the sulfation pattern of the antithrombotic heparan sulfate from endothelial cells. *Thromb Haemost*. 1995; 74(4): 1169-74.

## **Danksagung**

Diese Arbeit wurde im kardiologischen Forschungslabor des Universitätsklinikums Charité der Humboldt-Universität zu Berlin angefertigt.

Herrn Prof. Dr. med. G. Baumann als Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Charité Campus Mitte danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit im kardiologischen Forschungslabor.

Herrn Priv.-Dozent Dr. med. K. Stangl danke ich für die interessante Aufgabenstellung, seine Geduld und sein förderndes Interesse an dieser Arbeit.

Besonders danken möchte ich Frau Romy Becker, Herrn Dr. med. Th. Dschietzig und Herrn Dr. med. K. Alexiou für ihre unermüdliche Mitarbeit, ihre Ratschläge und praktische Hilfe sowie die Ermutigungen bei gelegentlichem Laborfrust.

## **Lebenslauf**

<b>Name</b>	Pfannenschmidt, Gerd
<b>Anschrift</b>	Friedrich-List-Str.41      12487 Berlin
<b>geboren am</b>	24.3.1972 in Frankfurt(Oder)

<b>Familienstand</b>	ledig
<b>Schulbesuch</b>	POS und EOS Frankfurt(Oder)
<b>Studium</b>	Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin seit 1993

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, daß die Dissertation von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 6.1.2000